

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

in Zusammenarbeit mit

Section Hematology and Oncology  
Department of Medicine  
University of Chicago, USA  
Ärztlicher Leiter: Walter M. Stadler, MD

# H-RAS-Mutationen in Kopf-Hals-Tumoren und Resistenzentwicklungen gegen Anti-EGFR-Therapien

## DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
**Katharina Ursula Endhardt**  
aus  
Günzburg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. U. Harréus

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Lars Lindner

Prof. Dr. Christoph Salat

Dekan: Prof. Dr. med dent. Reinhard Hickel

Datum der Promotion: 02.06.2016

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
1 Einleitung .....	1
1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich .....	1
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognose .....	1
1.1.2 Therapieoptionen .....	2
1.2 Karzinogenese der Kopf-Hals-Tumoren .....	4
1.2.1 Grundlagen der molekularen Genetik .....	4
1.2.2 Theorie der molekularen Karzinogenese .....	5
1.2.3 Molekulare Karzinogenese bei Kopf-Hals-Tumoren .....	8
1.3 Harvey-Rat-Sarcoma (HRAS) .....	13
1.3.1 Isoformen des Ras-Proteins .....	14
1.3.2 Ras als molekularer Schalter .....	14
1.3.3 Signaltransduktionswege des Ras-Proteins .....	15
1.3.4 Ras-Mutationen .....	17
2 Fragestellung und Zielsetzung .....	19
3 Materialien und Methoden .....	21
3.1 Zellkultur .....	21
3.1.1 Zelllinien .....	21
3.1.2 Kultivierung von Tumorzellen .....	22
3.2 Sequenzierung des HRAS Gen .....	22
3.2.1 Isolierung genomischer DNA .....	22
3.2.2 Sequenzen der Primer .....	23
3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	23
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	24
3.2.5 Sequenzierung .....	24
3.3 Inhibierung („ <i>Silencing</i> “) von Targetgenen .....	24
3.3.1 siRNA .....	24
3.3.2 Transfektion .....	25
3.3.3 Zellvitalität .....	26
3.3.4 Western Blot .....	26
3.4 Vitalitätstests .....	27
3.4.1 Inhibitoren .....	27
3.4.2 Inkubation der Zelllinien .....	27
3.4.3 Auslesung der Vitalität .....	28
3.4.4 Apoptose .....	28
3.4.5 Western Blot .....	28
3.5 Klonierung und Transfektion der HRAS-Mutation G12D .....	31
3.5.1 Isolation und Amplifikation der G12D Mutation .....	31
3.5.2 Gateway-Klonierung .....	32
3.5.3 Isolation der Plasmid-DNA .....	33
3.5.4 Restriktionsverdau und Gelextraktion der Plasmid-DNA .....	33
3.5.5 Ligation mit Expressionsvektor pCI-neo .....	33
3.5.6 Endotoxinfreie Plasmid-Extraktion .....	33
3.5.7 Transiente Transfektion .....	33
3.6 Software zur Datenauswertung .....	34
3.7 Statistische Analyse .....	35
4 Ergebnisse .....	36
4.1 Screening von HNSCC Tumorzellen und Gewebeproben auf Mutationen in HRAS .....	36
4.2 Effekte des HRAS Knockdowns in mutierten Zelllinien .....	37
4.3 HRAS-Mutationen induzieren Resistenz gegen EGFR-Inhibitoren .....	40
4.3.1 Resistenzlevel verschiedener Zelllinien .....	40
4.3.2 Effekte von Gefitinib auf die Hauptsignaltransduktionswege PI3K/Akt und Ras/Erk .....	41
4.3.3 Verhalten von HRAS-G12D-transfizierten Zellen bei EGFR-Inhibition .....	43
4.4 HRAS-Mutanten zeigen hohe Sensitivität gegenüber PI3K Inhibitoren .....	45
4.4.1 Zellvitalität bei Behandlung mit PI3K (+/- m-TOR) – Inhibitoren .....	45
4.4.2 Apoptoseinduktion .....	47
4.4.3 Effekte auf die Hauptsignaltransduktionswege PI3K/Akt und Ras/Erk bei PI3K-Inhibition ..	48

4.5	Untersuchungen zu Kombinationen von PI3K-Inhibitoren mit EGFR- bzw. MEK-Inhibitoren .....	49
4.5.1	Effekte auf die Hauptsignaltransduktionswege PI3K/Akt und Ras/Erk.....	49
4.5.2	Dosis-Wirkungsbeziehungen.....	50
5	Diskussion .....	53
5.1	HRAS-Mutationsanalysen.....	53
5.2	Identifikation von HRAS als Treiber.....	55
5.3	Cetuximab-Resistenz und die Bedeutung von HRAS .....	56
5.4	Resistenzmechanismus .....	58
5.5	PI3K als vielversprechender neuer therapeutischer Ansatzpunkt.....	60
6	Zusammenfassung .....	63
	Literatur.....	65
	Danksagung .....	71
	Lebenslauf.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
	Publikationsverzeichnis.....	72
	Eidesstattliche Versicherung .....	73



## Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	Factor 4E Binding Protein 1
AF6	Afadin
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arf	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
BAD	Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death
BAX	Bcl-2-like protein 4
BSA	Rinderalbumin
kDA	Kilodalton
CCND1	Cyclin D1
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium und Ham's F12 Nutrient Mix
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ErbB	V-Erb-B2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog
ERK 1/2	Extracellular-signal-regulated Kinase 1/2
et al.	And others
FBS	Fetale bovine serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FOXO	Forkhead-Box-Protein O
GAP	GTPase activating protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktoren
GFP	Green fluorescent protein

GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
Gsk-3	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour (Stunde)
Her2	Human epidermal growth factor receptor 2 (erbB2)
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humane Papillomviren
H-Ras	Harvey-Ras Protein
HRAS	Harvey-Ras Gen
IGF-1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
IgG	Immunglobulin G
IRF-6	Interferon Regulatory Factor 6
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
JAK	Januskinase
K-Ras	Kirsten-Ras Protein
KRAS	Kirsten-Ras Gen
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	P53 E3 Ubiquitin Protein Ligase Homolog
MEK	Erk Activator Kinase
Met	Met Proto-Oncogene (Hepatocyte Growth Factor Receptor)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PKCζ	Proteinkinase C zeta
PLCε	Phospholipase C epsilon
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
Rab	Ras-related in brain

Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma protein
Ral	Ras-related protein
RalGDS	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
Ran	Ras-related nuclear protein
RAS	Rat sarcoma
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
Rho	Ras homologue
RBD	Ras-Bindungsdomäne
RIN1	Ras and Rab interactor 1
Rb	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (UpM)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
mRNA	Messenger-RNA (deutsch: Boten-RNA)
siRNA	Small interfering-RNA (deutsch: Kurz-RNA)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (deutsch: Natriumlaurylsulfat)
SMAD	Mothers against decapentaplegic (Mad) and the gene Sma
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzmischung
TBST	TBS mit Tween 20 (Polysorbat 20)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TGF	Transforming Growth Factor
Tiam	T-lymphoma invasion and metastasis inducing protein 1
TP53	Tumor Protein P53
TP63	Tumor Protein P63
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor
V	Volt
Wnt	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-inodxyil- $\beta$ -D-galactopyranosid

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

#### 1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognose

Datenerhebungen der Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland (GEKID) zufolge zählen Kopf-Hals-Tumore mit Fallzahlen von jährlich knapp 13.500 Neuerkrankungen in Deutschland zu den sechs häufigsten Tumorerkrankungen unserer Zeit. Weltweit zeigen epidemiologische Daten eine etwa dreifach höhere Prävalenz bei Männern im Vergleich zu Frauen (Quelle: GEKID). Studien belegen, dass die höhere Exposition gegenüber den Hauptrisikofaktoren Tabak und Alkohol sowie der häufigere Umgang mit beruflichen Noxen verantwortlich gemacht werden können (Hashibe et al., 2007). Seit einigen Jahren zeichnet sich in der westlichen Welt durch das zunehmende Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung und dem damit einhergehenden verminderten Tabakkonsum ein Rückgang der Tabak-assoziierten Neuerkrankungen ab. Zeitgleich jedoch wurde die Infektion mit einem *high-risk* Papillomavirus (meist HPV-16) in Verbindung mit einer steigenden Inzidenz von virusassoziierten Tumoren des Mund-Rachen-Raumes als neuer Risikofaktor gewertet, der höchstwahrscheinlich aus dem Genitalbereich übertragen wird und dort auch für die Entstehung des Zervixkarzinoms verantwortlich gemacht wird (Gillison et al., 2000; Sturgis & Cinciripini, 2007).

Nach der geweblichen Herkunft des Tumors kann eine Untergliederung in Karzinome, Sarkome, Melanome und Lymphome vorgenommen werden. Nach wie vor sind über 90% der Kopf-Hals-Tumore karzinomatöser Herkunft, entstammen folglich dem Plattenepithel, dem Deckgewebe der Haut bzw. Schleimhaut.

Trotz des besseren Verständnisses der Tumorpathogenese und ungeachtet zahlreicher klinischer Studien zu neuen zielgerichteten Therapieansätzen haben sich bei stetig steigender Prävalenz seit Beginn der biomolekularen Forschung keine bahnbrechenden Erfolge im Überleben der Patienten verzeichnen lassen. Die Erkrankten sind nach wie vor schwierig zu behandeln und benötigen ein gutes interdisziplinäres Team. Studien der „*American Cancer Society*“ (ACS) und der „*Ontario Cancer Registry*“ (OCR) berichten von Stadien-unabhängigen 5-Jahres-Überlebensraten von etwa 61%, bei

metastasierten Karzinomen von lediglich 32%. Durch den nachgewiesenen starken prozentualen Anstieg der HPV-assoziierten Karzinome im Rachenbereich zeigt sich für diese Subgruppierung aufgrund eines besseren Therapieansprechens eine Steigerung der 5-Jahres-Überlebensraten von beispielsweise 53% (1975-1977) auf 63% (1999-2005), wohingegen in anderen Untergruppen, wie beispielsweise den Kehlkopfkarzinomen, keine verbesserten Überlebensraten verzeichnet werden konnten (D'Souza & Dempsey, 2011; Gupta, Kong, Peng, Miao, & Mackillop, 2009; Jemal, DVM, Siegel, Xu, & Ward, 2010).

### **1.1.2 Therapieoptionen**

Der häufig späte Zeitpunkt der Diagnosestellung in bereits fortgeschrittenem Stadium und die daraus resultierende schlechte Prognose des Krankheitsverlaufes sowie die relativ hohe Rate an Rezidiven und Zweittumoren lassen die Problematik der Kopf-Hals-Tumore erahnen. Die Mehrzahl der Patienten erleiden lokale bzw. regionale Rezidive, bei etwa 25 Prozent treten Fernmetastasen auf (Cooper et al., 2004). Frühe Tumorstadien, z.B. im Bereich des Kehlkopfes zeigen gute Überlebensraten von über 90%. Etwa 50% der Patienten hingegen werden in bereits lokal fortgeschrittenen Tumorstadien mit einem 5-Jahres-Überleben von 40-50% diagnostiziert (Jemal et al., 2010). Patienten mit rezidiviertem und fernmetastasiertem Tumor können in seltenen Fällen erneut operiert oder bestrahlt werden, erhalten in der Regel aber eine palliativ basierte Chemo- und/oder Radiotherapie und haben in diesem Stadium ein mittleres Überleben von lediglich 6-8 Monaten (Forastiere et al., 2003).

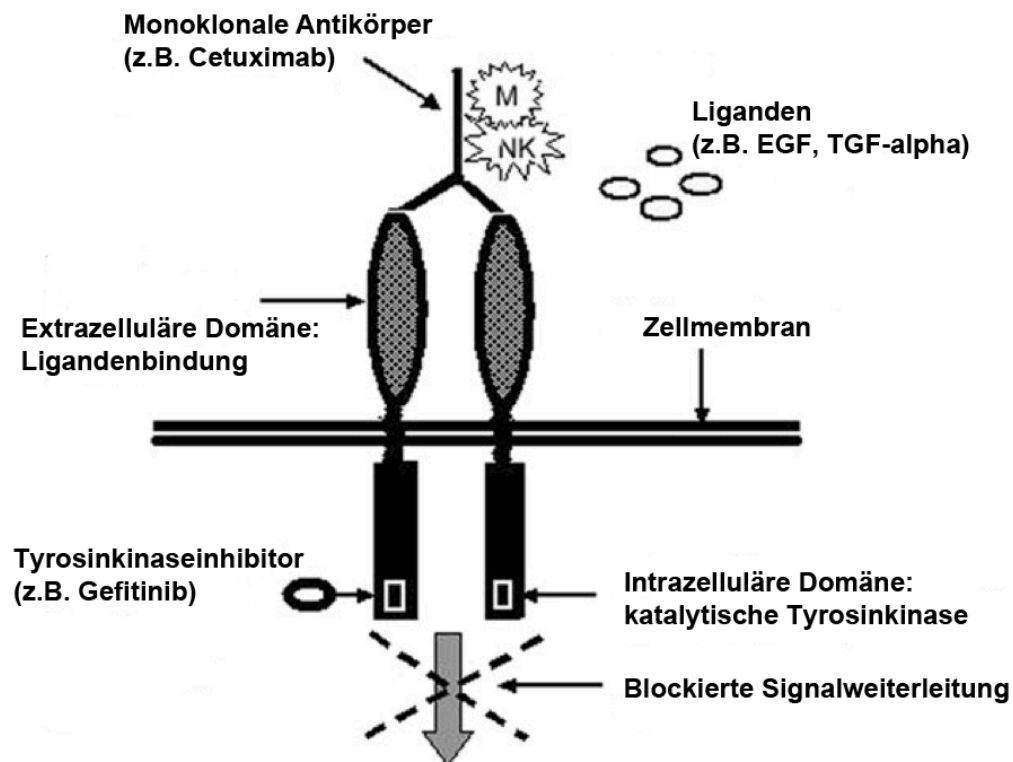
Eine geeignete Therapiestrategie zu wählen hat sich bis heute als schwierig herausgestellt und muss individuell anhand anatomischer Lokalisation, Tumorprogress, Operabilität, Toxizität der Therapeutika sowie Komorbidität und Präferenz des betroffenen Patienten angepasst werden. Weitere erschwerende Faktoren, die beachtet werden müssen, sind Infektionen sowie eine lokale Schmerzsymptomatik und Blutungen. Für die lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumore steht die primäre Operation mit oder ohne adjuvanter Therapie zur Verfügung. In frühen, lokal begrenzten Tumorstadien sind meist positive therapeutische Effekte auf Krankheitsprogress und Überlebensraten zu verzeichnen. Bei fortgeschrittenen Tumoren hingegen schränken unter anderem die zytotoxischen Nebeneffekte von Medikamenten die Therapiefortführung ein. Diese führten in den letzten Jahrzehnten trotz Fortschritte der

OP-Technik und Bestrahlungsmethoden zu einem Therapielimit (Vermorken et al., 2008).

Der EGF-Rezeptor, ein Membranrezeptor für Wachstumssignale, ist in 80-90% der plattenepithelialen Kopf-Hals-Tumore überexprimiert und mit schlechteren Überlebensraten vergesellschaftet (Ang et al., 2002). Der Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab kann den Rezeptor erkennen, andocken, diesen blockieren und so die Kommunikation über zellinterne Signalkaskaden unterbrechen. Die Erstzulassung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab für die Kombination mit herkömmlicher Radio- bzw. Chemotherapie im Jahr 2006 erweckte große Hoffnungen Toxizität-Limits und Therapieresistenzen zu überwinden und die Tumoren strahlensensitiver zu machen. Mit Ansprechraten von lediglich 8-14% auf eine Monotherapie mit Cetuximab blieb der erhoffte Erfolg zunächst aus (Vermorken, Herbst, Leon, Amellal, & Baselga, 2008). Die Kombination mit einer Radiotherapie bei lokal fortgeschrittenen Tumoren führte jedoch zu verbesserten 5-Jahres-Überlebensraten von 45.6% versus 36.4% bei alleiniger Strahlentherapie (Bonner et al., 2010). In zusätzlicher Kombination mit der gängigen platinbasierten Chemotherapie und einer Bestrahlung bei metastasierten bzw. rezidierten Tumoren konnte das progressionsfreie Überleben von 3.3 auf 5.6 Monate verlängert werden (Vermorken et al., 2008). Bis heute ist Cetuximab nach Zulassung durch die Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) das einzige moderne, zielgerichtete Therapeutikum, das in Kombination mit einer Strahlentherapie bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder als Kombinationsbehandlung mit einer Chemotherapie bei rezidierten und/oder metastasierten Tumoren der Kopf-Hals-Region angewandt wird (Quelle: EMA). Offen bleibt, weshalb manche Tumore trotz starker und häufiger Überexpression des EGF-Rezeptors relativ schlecht auf den Antikörper ansprechen. Das Expressionslevel des Rezeptors, egal welcher Höhe, dient daher nicht als klinisch nutzbarer prädiktiver Biomarker (Licitra et al., 2013).

Wir entschieden uns in der vorliegenden Untersuchung aufgrund der einfacheren Handhabung und Verfügbarkeit den EGFR-Inhibitor Gefitinib zu verwenden. Gefitinib (Handelsname Iressa™) blockiert die intrazellulären Tyrosinkinasen von verschiedenen Rezeptoren, vornehmlich die der ErbB-Familie, zu denen auch der EGF-Rezeptor zählt. 2009 wurde Gefitinib erstmals zur Erstlinientherapie von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen mit aktivierender EGFR-Mutation zugelassen. Für die Behandlung

der Kopf-Hals-Tumoren befindet sich Gefitinib momentan in Phase-III der klinischen Forschung. Bisher konnte lediglich ein Ansprechen der Tumore auf Gefitinib jedoch ohne Therapievorteile gegenüber bisherigen Medikamenten nachgewiesen werden (Stewart et al., 2009).



**Abb. 1.1 Wirkungsschemata der EGFR-Inhibitoren.** In der Grafik ist ein EGFR-Rezeptor mit seiner extrazellulären Ligandenbindungs-Domäne und seiner intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne dargestellt. Es sollen die verschiedenen Angriffspunkte der monoklonalen Antikörper und der Tyrosinkinaseinhibitoren verdeutlicht werden. Beide Inhibitoren blockieren im Endeffekt die intrazelluläre Signalweiterleitung (modifiziert nach Kundu & Nestor, 2012).

## 1.2 Karzinogenese der Kopf-Hals-Tumoren

### 1.2.1 Grundlagen der molekularen Genetik

Die Entdeckung der DNA-Doppelhelices als Bestandteil der Chromosomen und Grundbaustein des menschlichen Erbguts verhalf zu neuen Einblicken in die Struktur von Genen und den daraus kodierten Proteinen einer jeden Zelle (Watson & Crick, 1953). Die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms im April 2003 (Humangenomprojekt 1990-2003) lieferte eine Flut an Daten, die in den kommenden

Jahrzehnten analysiert und interpretiert werden soll. Für Forscher aus aller Welt stehen die entschlüsselten Informationen über das menschliche Erbgut in einer Online-Datenbank zur Verfügung (Quelle: NCBI). Hieraus entstehen moderne Forschungsansätze, die Zellwachstum, Zellteilung, Zelldifferenzierung, zelluläre Zusammenschlüsse und insbesondere deren Regulationsmechanismen erklären sollen.

Die Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin binden in einer bestimmten Reihenfolge an die Zuckermoleküle der Nukleinsäuren und kodieren so eine Aminosäuren-Sequenz, die den Bauplan der Proteine darstellt. Dauerhafte Erbgutveränderungen können sich auf Ebene der Chromosomenzahl (Genommutation), der Chromosomenstruktur (Chromosomenmutation), der repetitiven Sequenzen (Mikrosatelliteninstabilität), der Gensequenzen (Genmutationen) aber auch epigenetisch in Form gestörter Genexpression oder Genregulation abspielen. Eine Genmutation kann sich als Punktmutation/Substitution (Austausch einer einzelnen Base), als Deletion (Verlust einer Base) und als Insertion (Zugewinn einer Base) äußern. Insertion und Deletion führen in der Regel zu Leserasterverschiebungen und schwerwiegenden Veränderungen in der Proteinstruktur. Punktmutationen können als „*missense*“ (Sinnveränderung), „*nonsense*“ (Kodierung eines neuen Stop-Kodons) und „*silent*“ (Kodierung der gleichen Aminosäuren) klassifiziert werden (Wagener C. & Müller O., 2010, S.62-64). Mutationen, die zu einem veränderten Genexpressionsmuster führen, können Proteinstrukturen verändern und einen Funktionsverlust oder Funktionsgewinn des jeweiligen Proteins erzielen. Epigenetische Einflüsse äußern sich beispielsweise durch hypo- und hypermethylierte Promoter-Regionen, die zu abgeschwächter, fehlender oder verstärkter Expression der Gene führen können. Die verminderte Expression vieler Gene, wie beispielsweise DNA-Reparatur Enzyme, zieht eine genetische Instabilität und im Folgenden weitere genetische Läsionen nach sich (Catenacci & Seiwert, 2011).

### **1.2.2 Theorie der molekularen Karzinogenese**

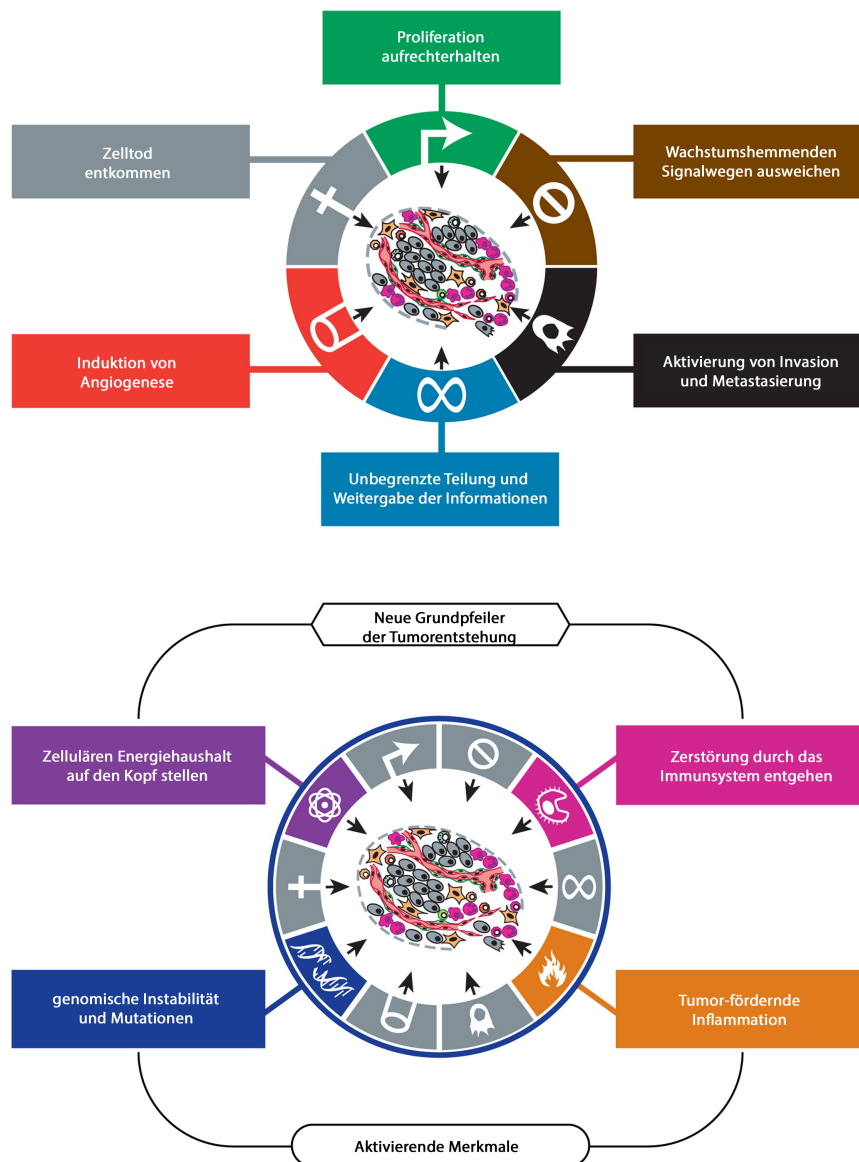
Der heute allgemeingültigen Theorie der Kanzerogenese liegt ein langjähriger Prozess bis zur malignen Transformation zu Grunde welcher durch eine komplexe Akkumulation vererbter und individuell erworbener Genmodifikationen gekennzeichnet ist. Daher hat sich in den vergangenen Jahren der Fokus zunehmend auf die molekulare Charakterisierung der transformierten Tumorzellen gerichtet. Hierbei werden genetische Alterationen wie Mutationen, Amplifikationen, Deletionen und Fusionen des Erbguts



untersucht, die zu einem Selektionsvorteil führen (=Treibermutationen) und im Gegensatz zu funktionell nicht relevanten Alterationen (=„Passagier“-Mutationen) an der Zelltransformation maßgeblich beteiligt sind (Catenacci & Seiwert, 2011).

Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg beschrieben schon im Jahre 2000 in ihrer Publikation „*Hallmarks of Cancer*“ die sechs wesentlichen Mechanismen, die als Folge von alterierten Genen zu einer Entartung der Zellen führen können. Die unkontrollierte, stetig aktive Proliferation der Zellen, das Ausschalten wachstumshemmender Signalwege, die Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod, die unbegrenzte Teilungsfähigkeit, die Gefäßneubildung zur adäquaten Sauerstoffversorgung, sowie die Fähigkeit der Tumordinvasion in angrenzendes Gewebe bzw. die Absiedlung von Tochtergeschwülsten in andere Organe (Metastase) zählen zu den Grundpfeilern der Krebsentstehung (s. Abb. 1.2). Diese Faktoren müssen weder obligat, in festgelegter Reihenfolge, noch zwingend aufgrund derselben genetischen Alterationen auftreten. Dies verdeutlicht die Vielfalt molekularer Phänotypen von klinisch isomorph erscheinenden Tumoren und folglich den Bedarf einer individuellen, molekularbiologisch basierten Therapie (Hanahan & Weinberg, 2000).

Im Jahr 2011 ergänzten Hanahan und Weinberg in ihrer Folgepublikation „*Hallmarks of Cancer: The Next Generation*“ ihre bis heute gültige Theorie um 4 weitere wichtige Faktoren. Die genetische Instabilität der Zellen und Entzündungsprozesse des tumorumgebenden Gewebes erklären ursächlich die Wirkung der bereits beschriebenen Mechanismen wie Proliferation, Resistenz gegenüber dem Zelltod und Ausschaltung der Wachstumshemmung. Die Möglichkeit der Energiegewinnung im sauerstoffarmen Milieu sowie die Fähigkeit, der Immunabwehr des Körpers zu entkommen, sind weitere wichtige neue Erkenntnisse der vergangenen Jahre (Hanahan & Weinberg, 2011).



**Abb. 1.2 Die Grundpfeiler der Krebsentstehung.** Die Grafik veranschaulicht die im Text beschriebenen Grundpfeiler der Entartung von Krebszellen. Das erste Schema zeigt die primären sechs Grundpfeiler, die im Jahr 2000 von Hanahan und Weinberg beschrieben wurden. Das zweite Schema zeigt deren Erweiterung um 4 zusätzliche Mechanismen im Jahr 2011. Zwei dieser Mechanismen (Energiehaushalt und Immunsystem) stellen neue Erkenntnisse dar, wohingegen die genomische Instabilität und die tumorfördernde Inflammation als eine übergeordneter und erklärender Mechanismus der primären 6 Grundpfeiler dienen (übersetzt nach Hanahan und Weinberg, 2000 und 2011).

Die Zelle, als Organismus betrachtet, kann sich bei Auftreten einer Mutation durch oben beschriebene Mechanismen einen Wachstums- und/oder Überlebensvorteil gegenüber den nicht mutierten Zellen im Gewebe verschaffen. Bei exponentiellem Wachstum kann sich die neue Zellmasse gemäß der Evolutionstheorie Darwins, die eine natürliche Auslese durch Mutation und Selektion begründet, in ihrem Wachstum durchsetzen. Bei klonaler Expansion dieser Zelle steigt die Wahrscheinlichkeit, dass in der Zellmasse

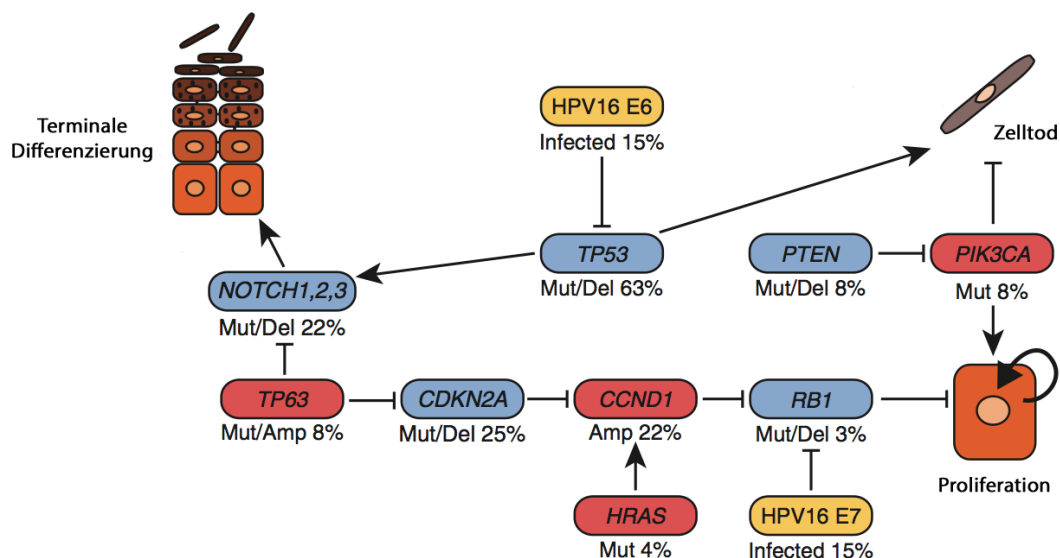
eine zweite Mutation auftritt, die dieser Zelle und ihren nachfolgenden Zellklonen einen zusätzlichen Selektionsvorteil verschafft. Auf diese Weise lässt sich eine schrittweise Progression bis zur Entstehung eines Tumors durch Umwelteinflüsse und Lebensstil erklären (Weinberg, 2013, S.5). Mutationen sind in der Regel dann essenziell, wenn sie in Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen lokalisiert sind und zu einer Funktionsänderung der Genprodukte und einer malignen Transformation führen (Treibermutation). Eine Mutation in einem Tumorsuppressorgen, dessen Produkt der Unterdrückung der Tumorentstehung dient, führt zum Verlust der protektiven Wirkung („*loss of function*“). Ein mutiertes Protoonkogen nennt sich Onkogen und fördert mit seiner neu erworbenen Funktion das Tumorwachstum („*gain of function*“) (Wagener C. & Müller O., 2010, S.79).

Seit Treiberläsionen und deren Wirkungsmechanismen in diversen Tumoren entschlüsselt wurden, besteht große Hoffnung neue Screening-Verfahren für eine sensitive Sekundärprävention zu entwickeln und molekulare Angriffspunkte für zielgerichtete Krebstherapien zu etablieren. Die translationale Onkologie als Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und Patientenversorgung hat es sich zur Aufgabe gemacht neue Forschungserkenntnisse schnellstmöglich in klinischen Studien umzusetzen. Auf diese Weise konnten in den vergangenen Jahren schon wichtige Fortschritte in der modernen gezielten Krebstherapie („*targeted therapy*“) gemacht werden. Als wegweisende neue Therapeutika sind beispielsweise Imatinib (BCR-Abl-Fusion, Leukämien), Cetuximab (EGF-Rezeptor Amplifikation / Mutation, Kolorektales Karzinom), Bevacizumab und Trastuzumab (HER2-Amplifikation, Mammakarzinom) im klinischen Alltag etabliert worden. Eine Anwendung erfolgt in der Regel erst nach molekularbiologischem Nachweis der spezifischen genetischen Alteration und oft, jedoch nicht zwingend in Kombination mit einer Chemo- und/oder Radiotherapie. Im Gegenzug existieren bekannte Resistenzmechanismen gegen die gezielten Therapeutika, so wird beispielsweise der monoklonale Antikörper Cetuximab beim kolorektalen Karzinom erst nach Ausschluss einer onkogenen KRAS-Mutation eingesetzt (Catenacci & Seiwert, 2011).

### **1.2.3 Molekulare Karzinogenese bei Kopf-Hals-Tumoren**

Auch bei der Entstehung der Kopf-Hals-Tumore spielt das Auftreten verschiedener genetischer Alterationen eine Rolle. Der Schwerpunkt liegt hierbei im Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen bzw. Genprodukten, die diesen Schlüsselproteinen vor-

bzw. nachgeschaltet sind. Stransky und Agrawal definierten in ihren 2011 publizierten Sequenzierungs-Studien die am häufigsten mutierten Gene aus insgesamt 194 HNSCC-Tumorgewebeproben. Hierbei zeigen sich häufig wiederkehrende Mutationsmuster, die vier physiologischen Regulationsmechanismen einer Zelle zugeordnet werden können: Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellinvasion/Metastasierung und Zellüberleben. Hierbei konnten neben den bereits vorbeschriebenen Schwachstellen TP53, CDKN2A, PTEN, PIK3CA, EGFR und HRAS auch erstmals „Notch“-assoziierte Gendefekte in Zusammenhang mit Kopf-Hals-Tumoren entdeckt werden, welche für die fehlerfreie Ausdifferenzierung der plattenepithelialen Zellen von Bedeutung sind. Wie in vielen anderen Tumoren, konnte erstmals auch in HNSCC ein dereguliertes TGF- $\beta$ -Signal detektiert werden, welches beispielsweise bei Tumorinitiation und Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen könnte (Agrawal et al., 2011; Stransky et al., 2011). Die Kopf-Hals-Tumore zeigen insgesamt ein sehr heterogenes Mutationsmuster und auch klinisch erhebliche Unterschiede im Therapieansprechen. Die Mutationen führen zu einer Selektion von Zellen mit instabilem Genom, somit scheint eine molekulare Klassifizierung von großer Bedeutung zu sein. Im Folgenden werden die wichtigsten Signalwege und potenziellen Angriffspunkte moderner Therapeutika besprochen.



**Abb. 1.3 Molekulare Alterationen und deren Häufigkeit bei Kopf-Hals-Tumoren.** Dargestellt sind die am häufigsten alterierten Onkogene (rot) und Tumorsuppressorgene (blau) in HNSCC. Unter den Genen sind die jeweiligen Mut(ations)-, Del(etions)- und Amp(lifikations)-Raten vermerkt. Die beiden Interaktionen der HPV-assoziierten Onkoproteine E6/E7 mit TP53 und RB1 sind gelb markiert (modifiziert nach Stransky et al. 2011)

### 1.2.3.1 Zellproliferation und p53/Rb/CDKN2A/CCND1

Das Gen TP53 kodiert den Transkriptionsfaktor p53, der DNA-Reparaturmechanismen, Zellzyklus und Apoptose kontrolliert und als sogenannter „Wächter des Genoms“ eine zentrale Stellung in den Zellen einnimmt. Es ist eines der meist mutierten Tumorgene des Menschen. Schon früh stellte man fest, dass das Tumorsuppressorgen TP53 in über 50 Prozent der Kopf-Hals-Tumore mutiert und/oder deletiert ist (Leemans, Braakhuis, & Brakenhoff, 2010). Nach heutigem Kenntnisstand finden sich bei funktionstüchtigem TP53-Gen häufig Defekte in den Genen MDM2, CCND1 und CDKN2A, deren Proteinprodukte meist direkt mit p53 interagieren und auf diese Weise Einfluss auf den p53-Signalweg nehmen (Millon et al., 2001; Okami et al., 1999; Reed et al., 1996). Folglich geht man von einer Beeinträchtigung des p53-assoziierten Signalweges in mindestens 80% aller Kopf-Hals-Tumore aus (Leemans et al., 2010). Durch mangelnde oder fehlerhafte Stabilisierung von p53 innerhalb der Zelle kann es zu einem Ausbleiben von Zellzyklusarrest und Apoptose kommen, die bei inakkuraten Mitosen und DNA-Schäden über ein gesundes und reguliertes Zellwachstum entscheiden. Eine weitere Stellschraube, die häufig durch das mutierte oder epigenetisch inaktivierte Gen CDKN2A mit daraus fehlerhaftem CDK-Inhibitor 2A (=p16) gehemmt wird, ist das Retinoblastom-Protein (pRb). Hierbei verliert dieses ähnlich wie p53 seine wachstumshemmende und schützende Funktion bei beschädigter DNA (Reed et al., 1996).

Schon vor mehr als 30 Jahren entdeckte man erstmals, dass die Onkogentranskripte E6 und E7 der Hochrisiko- (*high risk*-) Papillomaviren (hrHPV) mit pRb und p53 interagieren und sie in ihrer physiologischen Wirkung hemmen. Während das Onkoprotein E6 an p53 bindet und dessen Proteolyse induziert, führt das Onkoprotein E7 zu einer Inaktivierung von pRb. Folglich führt dies zu einer forcierten Transkription Zellzyklus-fördernder Gene und dem Verlust einer geregelten DNA-Reparatur (Münger et al., 1989; Scheffner, Huibregtse, Vierstra, & Howley, 1993). Da Oropharynxkarzinome mit steigender Tendenz HPV16-assoziiert sind und sich hierbei neue Angriffspunkte für HPV-positive Tumoren in Aussicht stellen (Westra, 2009), rückt der virale Einfluss auf Tumorentstehung und -progression in den Fokus aktueller Studien. Warum die HPV-Positivität eine bessere Prognose verspricht bleibt weiterhin zu entschlüsseln, doch finden sich auffälligerweise keine p53 und pRb Mutationen in diesen Zellen. In erster Linie geht man heute davon aus, dass die häufig niedrige

Noxen-Exposition dieser Patienten ein Fehlen der hoch karzinogenen und aggressiven präneoplastischen Prozesse nach sich zieht. Obwohl die viralen Onkoproteine mit p53 und pRb interagieren, scheint deren Netzwerk nicht in gleichem Maße beeinträchtigt, wie es bei Funktionsverlust durch Mutation der Fall ist.

### **1.2.3.2 Terminale Differenzierung und Notch/p63**

Als eine wichtige neue Erkenntnis auf dem Gebiet der Kopf-Hals-Tumore werden die häufig auftretenden Mutationen in den Genen Notch1 (12-15%), Notch2 und Notch3 (zusammen 3-5%) gewertet. Hinzu kommt ein ebenso hohes Risiko der Amplifikation und/oder Mutation von TP63 (8%), dessen Produkt, der Transkriptionsfaktor p63, ein Regulator des Notch-Proteins ist. Auch vorgeschaltete IRF6-Mutationen (5%) nehmen Einfluss auf den Notch-Signalweg. Bei den auftretenden Alterationen handelt es sich um inaktivierende Mutationen, weshalb eine Tumorsuppressorfunktion des Gens angenommen wird. Auch in Tierversuchen zeigte sich, dass Notch als Tumorsuppressor und wichtiger Initiator des Wachstumsstopps und der terminalen Zelldifferenzierung in stratifizierten Epithelien, wie beispielsweise der Haut und Schleimhäute, exprimiert ist. Im Gegensatz hierzu konnten im blutbildenden System aktivierende Notch-Mutationen nachgewiesen werden und scheinen in diesem Zusammenhang zu der Entwicklung von Leukämien beizutragen (Dotto, 2008).

### **1.2.3.3 Adhäsion/Invasion und TGF- $\beta$ /SMAD**

TGF- $\beta$  Wachstumsfaktoren führen nach Bindung an TGF- $\beta$  Rezeptoren zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung der Proteine SMAD2 und SMAD3, die wiederum Komplexe mit SMAD 4 bilden und weitreichenden Einfluss auf Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellmigration nehmen können. In Kopf-Hals-Tumoren wurden bei Deletionen auf Chromosom 18q größtenteils inaktivierende Mutationen in TGF-Rezeptorkomponenten und SMAD-Proteinen detektiert, welche aufgrund komplizierter Rückkopplungsmechanismen am ehesten Einfluss auf die Zellinvasion und Metastasierung nehmen. Eine Deletion von SMAD4 soll demnach lokale entzündliche Reaktionen verringern und zu erhöhten TGF- $\beta$ -Level führen (Bornstein et al., 2009), Verluste von TGF-Rezeptorkomponenten sollen im Zusammenspiel mit Ras-Mutationen eine Lymphknotenmetastasierung fördern (S.-L. Lu et al., 2006). Dieses Beispiel, wie auch der Notch-Signalweg, zeigen eindrücklich, wie vielseitig sich Mutationen in einem komplexen Netzwerk parallel ablaufender und ineinandergreifender Signalkaskaden darstellen können.

#### 1.2.3.4 Zellüberleben und EGFR/PIK3CA/PTEN/RAS

Neben den bereits beschriebenen Mechanismen werden auch regelmäßig Proteine beeinflusst, die den kontrollierten Eintritt in den natürlichen Zelltod (Apoptose) regulieren. Prominentester Vertreter ist hierbei die intrazelluläre Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die eine Vielzahl von Effektoren besitzt und auf diese Weise Einfluss auf Proliferation, Mobilität und Metabolismus der Zellen nimmt (Engelman, Luo, & Cantley, 2006). Die PI3K-Achse ist in einem Großteil der Kopf-Hals-Tumore hochreguliert und zählt neben p53 und pRb zu den am häufigsten fehlregulierten Signalachsen bei menschlichen Tumoren.

Vorangeschaltete Rezeptorkinasen werden nach Bindung von extrazellulären Wachstumsfaktoren aktiviert, oligomerisieren und geben die eintreffenden Signale durch Autophosphorylierung ihrer im Zytoplasma lokalisierten Tyrosinkinase-Domäne weiter. Die Mehrzahl der Rezeptoren gehört zur Familie der Tyrosin-Rezeptorkinasen (EGFR, FGFR, IGF-1R, PDGFR, VEGFR, Met). Sie unterscheiden sich primär in ihrer extrazellulären Domäne. Je nach Ligand-Rezeptor-Interaktion werden verschiedene Signalwege in der Zelle aktiviert. Einflussreiche Effektoren für Zellwachstum und Zellüberleben sind nach aktuellen Kenntnissen Ras/Raf/Mek, PI3K/Akt/mTOR und Jak/STAT. Mutierte und möglicherweise stetig aktive oder überexprimierte Rezeptoren können Wachstumssignale unkontrolliert über intrazelluläre Kaskaden in den Zellkern leiten (Müller & Wagener, 2009; Yarden & Sliwkowski, 2001). Mutationen im EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*), welche die überschießende Aktivität der PI3K-Akt-mTOR-Achse in HNSCC erklären könnten, stellten sich als eine Seltenheit dar. Mehrfach wurde jedoch von EGFR-Amplifikationen in HNSCC berichtet, welche statistisch mit einem schlechteren Überleben der Patienten korrelieren (Hama et al., 2009). Folglich lenkte sich die Aufmerksamkeit in den vergangenen Jahren auf die Entwicklung von anti-EGFR-Antikörpern, jedoch blieb bisweilen der erhoffte Durchbruch aus. Ursächlich für das mäßige Ansprechen von HNSCC auf die EGFR-Blockade könnte die parallele Aktivierung verwandter Rezeptorkinasen und/oder alternativer Signalwege sein, welche den Funktionsverlust kompensieren (Wheeler, Dunn, & Harari, 2010; Wheeler et al., 2008). Neben den Rezeptoren können auch Alterationen von Proteinen innerhalb der PI3K-Achse zu einer Dysregulation der Kaskade führen.

Somatische PIK3CA-Mutationen kodieren die katalytische Untereinheit p110-alpha der PI3-Kinase und aktivieren durch Phosphorylierung die nachgeschaltete Proteinkinase B (=Akt). Diese wiederum aktiviert als zentrale Schaltstelle eine Vielzahl weiterer Proteine, wie beispielsweise den mTOR-Komplex (*mammalian target of rapamycin*), die GSK-3alpha/beta (Glykogensynthase-Kinase), den Transkriptionsfaktor FoxO (Forkhead-Box-Protein O3) und das Transkriptionsfaktor-regulierende Protein MDM2. Der aktivierte mTOR-Komplex steigert die Aktivität der S6-Kinase sowie des Proteins 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E „eIF-4E“ -binding protein 1*). Beide Proteine regulieren die Translation hoch und führen zu einer gesteigerten Proteinsynthese und Zellproliferation. Durch direkte Beeinflussung der proapoptotischen Faktoren BAD und BAX wird der programmierte Zelltod gehemmt. Des Weiteren steht Akt in Wechselwirkung mit p53, pRb, dem Transkriptionsfaktor NF-kB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) und dem WNT-Signalweg (Wingless und Int-1). In welchem Ausmaß bei Kopf-Hals-Tumoren die einzelnen Achsen durch Akt herauf- bzw. herunterreguliert werden, bleibt größtenteils zu definieren. Der mTOR-Komplex gilt als wichtigster Effektor von PI3K, obgleich er von Faktoren wie beispielsweise Energie-, Ernährungs- und Sauerstoffstatus der Zelle beeinflusst zu sein scheint.

Das Tumorsuppressorgen PTEN als Gegenspieler der PI3-Kinase blockiert die Signaltransduktion und führt bei Mutation oder epigenetischer Hypermethylierung zu einem Funktionsverlust des Proteins und folglich zu fehlender Hemmung und indirekter Verstärkung des PI3K-Signales (Sansal & Sellers, 2004). Ob der PTEN-Verlust alleinig eine PI3K-Aktivierung auslösen kann, ist bisher nicht beschrieben.

Ras besitzt die Eigenschaft direkt an die p110-Untereinheit der PI3-Kinase zu binden und auf diese Weise eine Aktivierung des Signalweges herbei zu führen (Pacold et al., 2000). Welche Bedeutung HRAS-Mutationen in HNSCC zugeschrieben werden kann, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch weitestgehend ungewiss. Mögliche Signalweiterleitungen durch Ras-Proteine werden im Folgenden genauer erläutert.

### 1.3 Harvey-Rat-Sarcoma (HRAS)

Das Harvey-Rat-Sarcoma Protein gehört zur Familie der Ras-Proteine und konnte erstmalig 1982 als transformierendes Onkogen identifiziert werden (Chang et al., 1982). Bei den Ras-Proteinen handelt es sich um membranassoziierte G-Proteine die eine



zentrale Stellung in der Verschaltung von extrazellulären Wachstumssignalen ins Zellinnere einnehmen.

### **1.3.1 Isoformen des Ras-Proteins**

Bis heute sind über 150 Ras-ähnliche Proteine in Säugerzellen identifiziert. Nach Struktur und Funktion unterteilt man die Proteine in 5 Untergruppen: Ras, Rho, Rab, Arf und Ran. Vereinfachend werden der Ras-Subfamilie heute die 3 Isoformen KRAS, NRAS und HRAS zugeordnet, auch wenn Ras-ähnliche, noch unzureichend entschlüsselte Proteine wie MRAS, RRAS und ERAS der Familie theoretisch zugeordnet werden (Rajalingam, Schreck, Rapp, & Albert, 2007). Ras ist ein 189 Aminosäuren kodierendes, auf den Chromosomen 12p (KRAS), 11p (HRAS) und 1p (NRAS) lokalisiertes Gen und enthält den Bauplan für die homologen und strukturell verwandten p21-Proteine K-, N- und HRAS (Quelle: GENE CARDS). Primär wurden K(irsten)-RAS und H(arvey)-RAS von den Forschern Kirsten und Harvey als retrovirale Onkoproteine in Sarkomen der Ratte entdeckt. Erst später identifizierte man im Neuroblastom das dritte Gen der Ras-Familie (N(euroblastoma)-RAS) sowie zwei alternative Spleißvarianten von KRAS: KRAS-4A und KRAS-4B. Die beiden Spleißvarianten als auch die 3 Isoformen K/N/H-Ras unterscheiden sich in ihrer circa 25 Aminosäuren-langen hypervariablen Region (HVR) am C-terminalen Ende des Proteins, die für die posttranslationale Modifizierung zuständig ist. Die Proteine werden demnach an verschiedenen Stationen in der Zelle prozessiert und Membranverankerungen weichen voneinander ab (Hancock & Parton, 2005). In den heterogenen Zellen des menschlichen Körpers werden die Isoformen je nach Zellfunktion in sehr unterschiedlichem Maße exprimiert, wobei KRAS in allen Zellen annähernd ubiquitär vorhanden ist und im Gegensatz zu HRAS und NRAS für die normale Entwicklung einer Maus essenziell ist (Johnson et al., 1997).

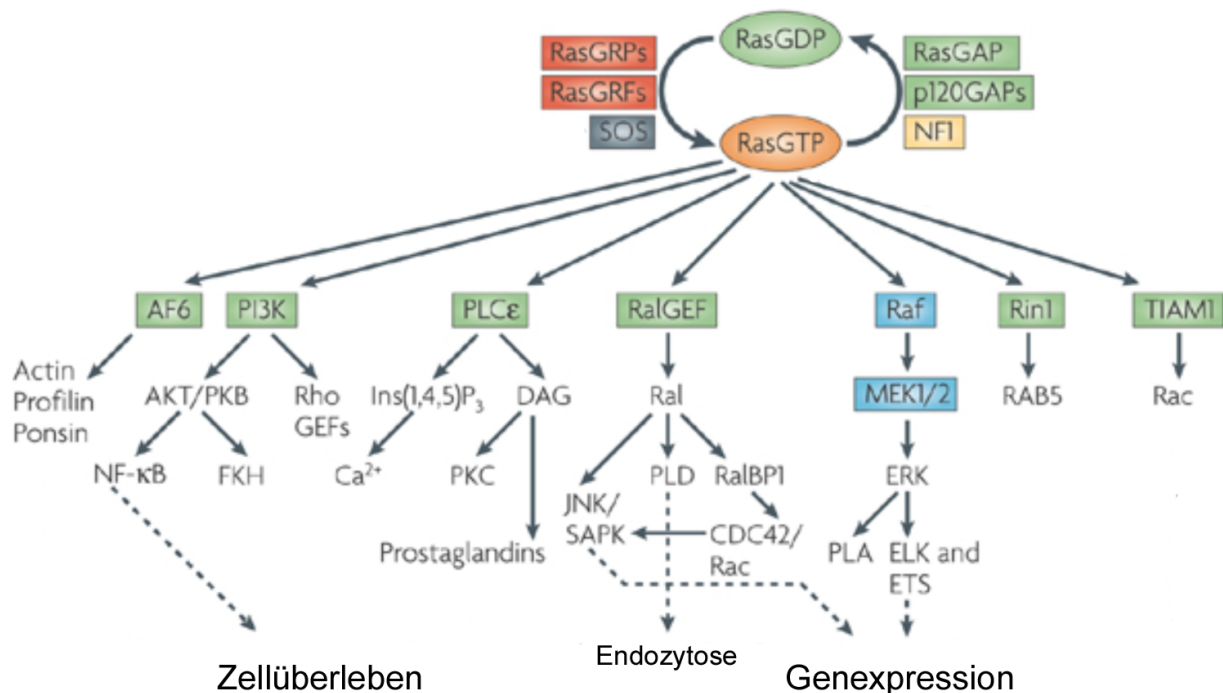
### **1.3.2 Ras als molekularer Schalter**

Die 21kD großen Ras-Proteine unterscheiden sich lediglich gering in ihrem strukturellen Aufbau und ähneln sich in ihrer Funktionalität. Aufgrund dessen wird häufig verallgemeinernd der Begriff „Ras“ für alle Subtypen verwendet. Als membranständiges monomeres G-Protein besitzt Ras Domänen für die Membranverankerung, für die GTP-ase Funktion und für die Bindung von GAPs und Austauschfaktoren. Analog zu anderen kleinen G-Proteinen, wie Rho, Rab, Arf und Ran, kann Ras demnach in einem GTP-gebundenen aktiven und einem GDP-gebundenen inaktiven Zustand vorliegen und

nutzt diesen Mechanismus, um als molekularer Schalter in diversen Signalwegen die Transkription zu regulieren. Nach Eintreffen eines stimulierenden Signales an der Zelloberfläche und aktivierten Transmembranrezeptoren wird über ein passendes Adapterprotein wie GRB2 der Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (*Guanine nucleotide exchange factor* „GEF“) aktiviert. Dieser wiederum verhilft Ras sein gebundenes GDP abzuwerfen und an selbiger Stelle ein GTP zu binden. Durch eine Konfigurationsänderung rutscht Ras in einen aktiven Zustand, kann eine Vielzahl von Ras-Effektoren binden und auf diese Weise Signale vom Rezeptor in die Zelle weiterleiten. Ras kann sich durch eine eigene, jedoch unzureichende GTPase-Aktivität hydrolisieren, aber muss von GTPase-aktivierenden Proteinen „GAPs“ unterstützt werden (Wagener C. & Müller O., 2010, S.230-233).

### **1.3.3 Signaltransduktionswege des Ras-Proteins**

Dank 30 Jahre intensiver Forschung an Ras und dessen Einbindung in zelluläre Prozesse konnten über 10 Effektoren des Ras-Proteins entschlüsselt werden, die den weitreichenden Einfluss des Onkoproteins auf den Zellstoffwechsel erklären. Neben den drei wichtigsten und am gründlichsten analysierten Effektorproteinen Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma protein*), Ral (*Ras-related protein*) und PI3K zählen auch AF6 (Afadin), PLC $\epsilon$  (Phospholipase C epsilon), PKC $\zeta$  (Proteinkinase C zeta), Tiam (*T-lymphoma invasion and metastasis inducing protein 1*) und RIN1 (*Ras and Rab interactor 1*) zu den Ras-Bindungsdomänen (RBD)-tragenden Proteinen (Rajalingam et al., 2007).



**Abb. 1.4 Organigramm der RAS Signaltransduktionswege** Wie im Text beschrieben, zeigt sich hier RasGTP mit seinen wichtigsten Effektoren, darunter Raf, Ral und PI3K, die insbesondere das Zellüberleben und die Genexpression regulieren (modifiziert nach Karnoub & Weinberg, 2008).

Der Ras-Raf-MEK-Erk Signalweg, als einer von zahlreichen gleichartig strukturierten Kaskaden in Säugetier-Zellen besteht aus einer Abfolge miteinander kommunizierender mitogen aktivierter Proteinkinasen (MAPKKK: Raf -> MAPKK: MEK -> MAPK: Erk), welche in phosphoryliertem, folglich aktiviertem Zustand weitere nachgeschaltete Kinasen phosphorylieren. Erk1, Erk2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*) phosphorylieren die Kinasen RSK (*ribosomal S6 Kinase*) und MNK (*MAPK Interacting Kinase*) translozieren in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren wie Ets, Elk-1 und TIF1A phosphorylieren und auf diese Weise die Translation von Proteinen beeinflussen. Die Signifikanz der Raf-MEK-Erk-Schaltung für die maligne Transformation der Zellen wurde von der Beobachtung untermauert, dass auch eine onkogene Raf-Kinase als nachgeschaltetes Protein von Ras, den durch Ras-Mutation transformierten Phänotyp nachahmen kann.

Ras kann über die 4 Ral-Austauschfaktoren RalGDS, RGL, RGI2/Rlf und RGI3 die Ral-GTPase aktivieren. 2004 konnte das Team um R.A.Weinberg erstmalig nachweisen, dass Ral eine ausschlaggebende Rolle in der Zelltransformation einnehmen kann (Rangarajan et al., 2004). Auch wenn die Schaltungen des Ral-Netzwerkes bisher nur

mangelhaft dargelegt werden konnten, scheint vornehmlich die Zellproliferation und das Zellüberleben positiv beeinflusst.

Schon 1994 konnte J. Downward in seiner Publikation „*Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*“ darlegen, wie aktiviertes Ras mit der katalytischen p110-Untereinheit der PI3K interagieren kann (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Über Ras kann demnach auch die in 1.2.3.4 aufgeführte PI3K-Akt-mTOR-Achse aktiviert werden, welcher ein ausschlaggebender antiapoptotischer Effekt zugesprochen wird. Die verschiedenen Ras-Isoformen binden ihre Effektoren mit unterschiedlicher Intensität. Beispielsweise stellt H-Ras einen stärkeren Aktivator für die PI3K-Achse dar, wohingegen K-Ras deutlich potenter die Raf-Kinase aktivieren kann (Yan et al., 1998).

#### **1.3.4 Ras-Mutationen**

Schon 1989 beschrieb der Niederländer J.L. Bos in seinem berühmten Artikel „*ras oncogenes in human cancer*“, dass etwa 20% aller menschlichen Tumore inaktivierende Mutationen in Ras Proteinen aufweisen. Während Funktion und Wirkung von Ras noch weitestgehend unklar waren, konnte bereits zu jener Zeit beobachtet werden, dass alterierte Ras-Proteine einen extrem starken Einfluss auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung nehmen. Auch schienen manche Tumorentitäten, vornehmlich Adenokarzinome und Leukämien, sehr hohe Alterationsraten zu beherbergen, die in der Regel lediglich eine der 3 Isoformen K-, N- oder HRAS betraf (Bos, 1989). Der „*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*“ (COSMIC) ist eine Internet-Plattform, in der sämtliche somatische Mutationen aus Fach-Publikationen gesammelt werden. Auch nicht mutierte Gewebeproben werden registriert. Auf diese Weise lassen sich in diversen Tumoren Mutationsraten für ein definiertes Ziel-Gen berechnen. Die aktuelle Datenlage (Juni 2014) ergibt die folgenden Mutationsraten pro Anzahl der sequenzierten Tumorproben: 21,4% in KRAS (26.621 aus 124.694), 5,8% in NRAS (3167 aus 55047) und 2,9% in HRAS (930 aus 32527). KRAS-Mutanten treten gehäuft in Lungen- (15,94%), Dickdarm- (34,50%) und Bauchspeicheldrüsenkrebs (57,20%) auf, NRAS hingegen vorwiegend in Haut- (15,53%) und Nerventumoren (17,45%), HRAS in Blasen- (9,85%), Gebärmutterhals- (8,21%) und Speicheldrüsentumoren (14,64%) als auch in Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes (8,04%). (Quelle: SANGER)

Aktivierende Ras-Mutationen, die sich fast ausschließlich in den kritischen Hotspot-Kodons 12, 13 und 61 finden, sind in etwa 98% der Fälle Missense-Mutationen und führen zu einer Änderung der Aminosäuren-Sequenz mit einhergehender Konformationsänderung in der Schalter („*Switch*“)-Region des Proteins. Hierdurch verliert Ras seine GTPase-Funktion und verharrt in einem dauerhaft aktivierten Zustand des G-Proteins ohne in den „Off“-Zustand schalten zu können. Signale werden unabhängig von eingehenden Stimulationen durch Zellmembranrezeptoren gesendet. Ras Mutationen schaffen somit eine maligne Disposition obgleich sie nicht als alleinige Alteration zu einer Zelltransformation führen können (Wagener C. & Müller O., 2010, S.231-232).

## 2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Gene der RAS-Familie sind in einer Vielzahl verschiedener Tumorerkrankungen alteriert. In plattenepithelialen Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC), die keine KRAS-Mutationen beherbergen, ließ sich in circa 5% der analysierten Proben eine HRAS-Mutation nachweisen. Während die Bedeutung von onkogenem KRAS in Kolon- und Lungenkarzinomen in zahlreichen Publikationen gut charakterisiert wurde, wirft HRAS bezüglich Kanzerogenese und Tumorprogression weiter ungeklärte Fragen auf.

Ziel dieser in-vitro Studie war es anhand unterschiedlicher methodischer Ansätze die Stellung und Auswirkung von mutiertem HRAS in HNSCC zu untersuchen. Es wurden Zellkulturen und Gewebeproben auf Mutationen in den HRAS-Hotspots Kodon 12, 13 und 61 sequenziert. Hierbei sollten einerseits Vergleiche mit publizierten Sequenzierungsdaten gezogen werden, andererseits passende Zelllinien für die geplanten Versuchsreihen ausfindig gemacht werden. Es wurde dann zunächst untersucht, welchen Einfluss H-Ras in mutierten und nicht mutierten Zellreihen auf Zellwachstum und Zellüberleben hat. H-Ras, das eine zentrale Stellung in den Signalkaskaden der Zellen einnimmt, sollte hierfür mittels RNA-Interferenz in seiner Expression unterdrückt und das Zellüberleben beobachtet werden.

In HNSCC zeigen Tyrosinkinaseinhibitoren bisher geringe Therapieerfolge, weshalb die Frage nach Resistenzmechanismen an Dringlichkeit gewinnt. Ein weiteres Ziel dieser Studie war es folglich, HNSCC-Zelllinien auf Resistenzen gegen EGFR-Inhibitoren zu testen und zelluläre Anpassungsreaktionen auf Proteinebene darzustellen. Durch das Einschleusen von HRAS-Mutationen mittels Vektor sollten Zellen mit neu erworbener Mutation auf eine vermutete Resistenzzunahme gegenüber EGFR-Inhibitoren geprüft werden.

Um alternative Therapieansätze zu verfolgen, sollte primär ein Ansprechen der mutierten Zelllinien auf PI3K-Inhibitoren untersucht werden. Hierfür testeten wir die Sensitivität der Zelllinien auf PI3K-Inhibitoren bzw. kombinierte PI3K-/mTOR-Inhibitoren. Regulative Signalveränderungen auf Proteinebene wurden mit Hilfe von Western Blots dokumentiert und mit den Ergebnissen nach EGFR-Inhibition verglichen. In Hinblick auf die HRAS-Mutationen und deren wahrscheinlichste Signalschaltung innerhalb der Zelle, wurden die Versuchsreihen anschließend mit Kombinationen aus PI3K-Inhibitor

BEZ235 und dem EGFR-Inhibitor Gefitinib bzw. dem MEK-Inhibitor AZD6244 behandelt. Mit Hilfe von Dosis-Wirkungskurven sollten synergistische und antagonistische Effekte aufgedeckt und Proteinlevel analysiert werden, damit der potenzielle therapeutische Nutzen der dualen Blockade beider Hauptsignalachsen bewertet werden kann.

Die vielfältigen Behandlungen und Kombinationsbehandlungen sowie die detaillierte Analyse der Proteinaktivierungen ermöglichen erste Rückschlüsse auf die Signalverschaltungen des onkogenen HRAS in HNSCC und unterstützen neue therapeutische Empfehlungen. Diese sollen anschließend auf Basis unserer Ergebnisse in Xenograft-Modellen belegt werden.

### 3 MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1 Zellkultur

##### 3.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Organ TNM	Sex	Alter	HPV Status	Medium	Quelle
BB49-HNC	UADT	F	70	-	IMDM	Ludwig Institute for Cancer Research, Brüssel, Belgien
H357	Zunge STNMP 1	M	32	-	DMEM/F12	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
HN4	Zunge T2N0M0	M	n/a	-	DMEM	J. Silvio Gutkind, National Institutes of Health, USA
HN5	Mundhöhle T2N0M0	M	n/a	-	DMEM	Ludwig Institute for Cancer Research, London, UK
HN6	Mundhöhle T2N0M0	M	n/a	-	DMEM	J. Silvio Gutkind, National Institutes of Health, USA
HN-SCC135	Harter Gaumen	n/a	n/a	-	DMEM/F12	n/a
SCC9	Zunge T2N1M0	M	25	-	DMEM/F12	Dr. Mark Lingen, University of Chicago, USA
SCC15	Hypopharynx T4N1M0	M	55	-	DMEM/F12	Dr. Mark Lingen, University of Chicago, USA
SCC35	Larynx T4N0M0	M	n/a	-	DMEM/F12	Dr. Ralph Weichselbaum, University of Chicago, USA
SCC61	Zunge T4N2bM0	n/a	n/a	-	DMEM/F12	Dr. Mark Lingen, University of Chicago, USA
SCC68	Zunge T1N0M0	M	n/a	-	DMEM/F12	J. Rheinwald, Harvard Medical School, Boston, USA
UM-SCC23	Epiglottis T3N0M0	F	36	-	DMEM	University of Michigan, USA
UM-SCC47	n/a T3N1M0	M	n/a	HPV 16	DMEM/F12	University of Michigan, USA
UPCI-SCC90	n/a T2N0M0	M	46	HPV 16	DMEM/F12	University of Michigan, USA

**Tabelle 3.1 Auflistung der verwendeten HNSCC-Zelllinien** (n/a (*not available*): nicht verfügbar; UADT (*upper aerodigestive tract*): Mundhöhle, Schlund und Kehlkopf )



### 3.1.2 Kultivierung von Tumorzellen

Die Kultivierung der aufgelisteten Zelllinien erfolgte bei 37°C und kontrollierter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank. Dem jeweils empfohlenen Kulturmedium (DMEM/F12, DMEM und IMDM) wurde 10% fötales Rinderserum (FBS), 100IU/ml Penicillin-Streptomycin (Cellgro®, Manassas, VA, USA) und 2mM/ml HyClone L-Glutamin (Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) beigemischt. Mediumwechsel und Subkultivierung wurden entsprechend Zellwachstumsgeschwindigkeit und Nährstoffverbrauch alle 1 bis 4 Tage durchgeführt. Zum Passagieren der Kultur wurden Zellen von 80 - 95% Konfluenz zunächst zweifach mit phosphatgepufferter Salzlösung (1X PBS, Cellgro®) abgewaschen und anschließend für maximal 4 – 8 Minuten mit 0,05% / 0,25%igem Trypsin EDTA 1X (Cellgro®) inkubiert, bis durch leichtes Klopfen eine möglichst vollständige Lösung von der Oberfläche des Kulturgefäßes stattgefunden hat. Dies kann gut unter dem Lichtmikroskop überprüft werden. Zur Inaktivierung von Trypsin wurde die Zellsuspension in serumhaltiges Medium überführt, pelletiert, in frischem, nährstoffreichem Medium in gewünschter Konzentration resuspendiert und in neue Kulturflaschen ausgesät. In der Regel wurde zum Passagieren ein Verhältnis von 1:3, bei besonders schnell wachsenden Zellen bis 1:5 gewählt. Zur Langzeitkonservierung wurden Konzentrationen von  $1 \times 10^6$  geernteter Zellen in Einfriermedium (70% FBS, 20% Medium, 10% DMSO) resuspendiert und in sterilen Kryoröhrchen eingefroren. Zum schonenden Einfrieren wurden die Zellen zunächst in Isopropanol-Boxen langsam auf -80°C Grad gekühlt bevor eine langfristige Einlagerung in flüssigem Stickstoff möglich war. Die Arbeiten erfolgten in einer sterilen Zellkultur-Werkbank unter Verwendung von Einwegbehältern und Einwegpipetten. Vor erstmaliger Verwendung und nach jedem Auftauen wurden alle Zelllinien routinemäßig auf eine Mykoplasmen Kontamination getestet.

## 3.2 Sequenzierung des HRAS Gen

Zur Detektion von HRAS-Mutationen wurde DNA aus den HNSCC-Zelllinien isoliert, die gewünschte Gensequenz mittels PCR vervielfältigt und anschließend auf Punktmutationen sequenziert.

### 3.2.1 Isolierung genomischer DNA

Die DNA der Zellkulturen wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Deutschland) isoliert und entsprechend den zugehörigen Protokollen des Kits

aufgearbeitet. DNA-haltige Lösungen wurden anschließend auf -20°C gelagert oder direkt sequenziert. Extrahierte DNA-Proben von 35 Zelllinien und 52 Gewebeproben wurden bereits intern von der Arbeitsgruppe Tanguy Seiwert (University of Chicago) zur Verfügung gestellt. Zur Ergänzung wurde aus weiteren 14 HNSCC-Zelllinien genomisches Material isoliert.

### 3.2.2 Sequenzen der Primer

Protein/ Codon	Name	Länge (bp)	Tm(°C)	%GC	Amplikon (bp)	Sequenz
<b>HRAS</b> Codon 12 / 13	HRAS_Fwd1	20	61	65	164	5'-GGCAGGAGACCCTGTAGGAG-3'
	HRAS_Rev1	19	59	53		5'-GGGTCGTATTCGTCCACAA-3'
<b>HRAS</b> Codon 61	HRAS_Fwd2	20	60	50	177	5'-GGGTCGTATTCGTCCACAA -3'
	HRAS_Rev2	20	59	45		5'-TGGTGGATGTCCTCAAAAGA -3'

**Tabelle 3.2 Primersequenzen** für Vorwärts-Primer (Fwd/Forward) und Rückwärts-Primer (Rev/Reverse).

### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Vorbereitend wurde ein Mastermix aus 1µl 10X Buffer, 0,8µl MgCl<sub>2</sub>, 0,6µl Desoxyribonucleosidtriphosphate, 1µl Vorwärts-Primer, 1 µl Rückwärts-Primer, 0,1µl AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems®, USA) und 4,5µl Milli-Q Water (Millipore, Massachusetts, USA) gemischt. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde je 1µl DNA-Lösung mit 9µl der Mastermix-Lösung zu einem Gesamtvolumen von 10µl pro Reaktionsgefäß vermischt. Die PCR-Reaktion wurde anschließend im Thermocycler (Bio-Rad, Californien, USA) mit dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer
Initiale Denaturierung	1	94	10 Minuten
Denaturierung	35	94	30 Sekunden
Primerhybridisierung		57	25 Sekunden
Elongation		72	45 Sekunden
Finale Elongation	1	72	7 Minuten

**Tabelle 3.3 PCR-Protokoll.**

### 3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis des PCR Produkts erfolgte zunächst mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei wandern DNA Fragmente im Gel entlang eines elektrischen Feldes und trennen sich nach Größe bzw. negativer Ladung auf. Für ein 1,2%iges Agarosegel wurden 1,2g Agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, USA) in 100ml 1X Tris-Acetat-EDTA Puffer (10x TAE, Invitrogen, in einer 1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser) aufgekocht und nach Zugabe von 2µl Ethidiumbromid als Horizontalgel gegossen. Das erhärtete Gel wurde im Elektrophoresetank vollständig mit 1X TAE Puffer übergossen und anschließend mit den DNA-Lösungen (5µl PCR Produkt mit 1µl 6X Farbindikator Bromophenolblau) sowie einer 100bp DNA-Leiter (Fermentas, USA) beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei einer Spannung von 90 V. Die Detektion der DNA Banden erfolgte im UV-Transilluminator.

### 3.2.5 Sequenzierung

Zunächst wurden die PCR-Produkte mit ExoSAP-IT (USB®, USA) aufgereinigt. Die im Produkt enthaltenen Enzyme Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase dienen der Entfernung übrig gebliebener Primer und Desoxyribonucleosidtriphosphate. Eine Mischung aus 2µl ExoSAP-IT und 5µl des PCR-Produkts wurde für 25 Minuten auf 37°C, gefolgt von 15 Minuten auf 80°C im Thermocycler inkubiert. Die aufgereinigten Proben wurden nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) sequenziert. Die DNA-Sequenzierung erfolgte in zentralen Sequenzierungslaboren der *University of Chicago*.

## 3.3 Inhibierung („*Silencing*“) von Targetgenen

### 3.3.1 siRNA

Bei der RNA Interferenz werden spezifische Gene in ihrer Expression inhibiert, indem doppelsträngige siRNA (small interfering RNA) in die Zelle eingeschleust wird, woraufhin durch Spaltung der Duplex-RNA und Komplexbildungen der enzymatische Abbau der entsprechenden komplementären mRNA-Stränge hervorgerufen wird. Zum Ausschluss unspezifischer Interaktionen der eingesetzten siRNA wurden zwei unabhängige HRAS-spezifische Sequenzen (HSC.RNAI.N001130442.12.1 und HSC.RNAI.N001130442.12.2) der Firma IDT® (Iowa, USA) in unserem Experiment verwendet. Um die Effizienz der Transfektion sicher zu stellen, wurde die Positivkontrolle AllStars HS Cell Death (Quiagen, Californien, USA) eingesetzt, welche

für das Zellüberleben obligate Gene in humanen Zellen ausschaltet. Im Gegenzug wurde zum Ausschluss unspezifischer Hemmeffekte die Negativkontrolle NC1 (IDT®) transfiziert.

Duplex Name	Stoffmenge (nm)	Eingesetzte Konzentration (nM)	Sequenz
HSC.RNAI.N001130442.12.1	10	100	5'-GGAUCACAGUAAAUAUUGGAUGGT-3' 3'-ACCCUAGUGUCAUUUAAUAACCUACCA-5'
HSC.RNAI.N001130442.12.2	10	100	5'-AGCGAUGACGGAAUAUAAGCUGGTG-3' 3'-CCUCGCUACUGCCUUAUAUUCGACCAC-5'
NC1 Negative Control	5	100	5'-CGUUAUUCGCGUAUAAUACGCGUAT-3' 3'-CAGCAAUUAGCGCAUUAUUAUCGCGCAUA-5'
AllStars HS Cell Death Control	5	100	Mischung multipler siRNA Sequenzen die mit sehr hoher Effizienz ubiquitär exprimierte, überlebensnotwendige Gene in humanen Zellen ausschalten.

**Tabelle 3.4 siRNA-Sequenzen.**

### 3.3.2 Transfektion

Zellkulturen von 70-80% Konfluenz wurden geerntet und in 96-Well-Platten ausgesät. Zunächst musste die richtige Zelldichte für die Aussaat einer jeden Zelllinie ermittelt werden, indem Konzentrationen in einer Skala von  $0,5 - 2 \times 10^4$  Zellen pro Well als Wachstumsplatten getestet wurden. Für die in dieser Studie verwendeten Zelllinien bewährte sich im Allgemeinen eine Zelldichte von 1 bis maximal  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Well, damit die Zellen nach 24 Stunden eine Dichte von 40 bis 60% vorwiesen. Nach Aussaat wurden die Zellen zum Zwecke der Adhäsion zunächst für 24 Stunden auf dem Flachboden inkubiert. Anschließend wurde das Wachstumsmedium entfernt und eine Magnet-assoziierte Transfektion nach Herstellerprotokoll durchgeführt (MATra, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland). Auch hierbei musste primär die optimale siRNA-Konzentration und Dauer der Inkubationsperiode ermittelt werden. Bei dieser sollten einerseits mindestens 80% der Zellen in der Negativkontrolle überleben, andererseits ein effektiver Knockdown nachgewiesen werden. In unseren Versuchsreihen bewährte sich ein Knockdown für 72 Stunden mit 100nM siRNA. Da die eigentliche Transfektion nach einer 30-minütigen Magneteinwirkung auf die 96-Well-Platte abgeschlossen ist, wurde nach weiteren 2, 24 und 48 Stunden nach vorsichtigem Absaugen frisches Medium zugeführt. Hierdurch sollte ein Ausbleiben des Zellwachstums aufgrund von Nährstoff- / Wachstumsfaktorenmangel verhindert werden.

### **3.3.3 Zellvitalität**

Zur Bestimmung des quantitativen Zellüberlebens wurde 72 Stunden nach Transfektion eine DNA-Färbung mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Syto®60 vorgenommen (Licor Bioscience). Um die adhärenenten Tumorzellen für den Farbstoff aufnahmefähig zu machen, wurden die 96-Well-Platten anhand eines modifizierten „In-Cell-Western“-Protokolls aufbereitet. Nach schonendem Absaugen des Mediums wurden die Zellen für 20 Minuten in 4%iger Formaldehyd-PBS-Lösung fixiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen 5 mal 5 Minuten mit 0.1%iger Triton®-X100-PBS-Lösung inkubiert. Hierbei lösen sich Proteine aus der Zellmembran und diese wird permeabel. Nach Permeabilisierung mussten die Wells 3-fach mit PBS gewaschen werden, anschließend konnten die Zellen für 45 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit Syto®60-Lösung (1:10.000 Verdünnung in Odyssey® Blocking Buffer) inkubiert werden. Durch gründliches Auswaschen der Färbelösung mit PBS, gegebenenfalls auch durch kurzzeitige Inkubation mit PBS auf einem Schüttler, konnte eine hohe Hintergrund-Intensität vermieden werden. Mit Ausnahme des letzten Schrittes im Protokoll wurde eine Inkubation auf dem Schüttler vermieden da hohe mechanische Kräfte auf die Zellen einwirken und zu einer Ablösung vom Flachboden führen können. Ausgelesen wurden die Platten im Wellenbereich von 700nm mittels Nah-Infrarot (NIR)-Fluoreszenz im Odyssey® Infrared Imaging System.

### **3.3.4 Western Blot**

Zur Darstellung der Proteinlevel nach siRNA-Transfektion wurden Zellkulturen mit entsprechend angepassten Mengen siRNA in 60mm durchmessenden Petrischalen transfiziert und anschließend wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben zu Proteinlysaten verarbeitet und in Western Blots bildlich dargestellt.

### 3.4 Vitalitätstests

#### 3.4.1 Inhibitoren

Inhibitor	Target	Beschreibung	Selleck-Chemicals
<b>NVP-BEZ235</b>	PI3K, mTOR	Selektive Hemmung der p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ , p110 $\gamma$ (IC <sub>50</sub> : 4nM, 75nM, 5nM, 7nM) + mTOR (K <sub>i</sub> : 20.7nM)	#S1009
<b>GDC-0980</b>	PI3K, mTOR	Selektive Hemmung der PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$ , PI3K $\gamma$ (IC <sub>50</sub> : 3nM, 33nM, 3nM, 75nM) + mTOR (K <sub>i</sub> : 17nM)	#S2696
<b>GDC-0941</b>	PI3K	Selektive Hemmung der PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$ und PI3K $\gamma$ (IC <sub>50</sub> : 3nM, 33nM, 3nM, 75nM)	#S1065
<b>Gefitinib (Iressa)</b>	EGFR	Effektive Hemmung aller Tyrosinkinasen an EGFR: Tyr1173, Tyr992, Tyr1173 and Tyr992 (IC <sub>50</sub> : 37 nM, 37nM, 26 nM and 57 nM)	#S1025
<b>AZD6244 (Selumetinib)</b>	MEK1	Hochpotenter MEK1 Inhibitor der eine Phosphorylierung von ERK1/ERK2 verhindert. (IC <sub>50</sub> : 14nM)	#S1008

**Tabelle 3.5 Inhibitoren**

#### 3.4.2 Inkubation der Zelllinien

70-80% konfluent gewachsene Zellen wurden geerntet und in 96-Well Platten in einer Konzentration gesät, in der die jeweilige Zelllinie in unbehandelten Kontrollfeldern bis zum Ende des Versuchs keine Konfluenz erreichen sollte ( $1-3 \times 10^3$  Zellen/Well). Für 24 Stunden wurden die gesäten Platten zunächst mit Wachstumsmedium inkubiert, um die Adhärenz der Zellen an die Oberfläche zu gewährleisten. Verdünnungsreihen der jeweiligen Medikamente wurden separat in frischem Medium angefertigt und im Rahmen eines Mediumwechsels auf die Zellen gegeben. Die Berechnungen werden hier an einem Beispiel dargelegt:

##### NVP-BEZ235:

Stammlösung: 25mM (in DMSO)

Arbeitslösung: 10 $\mu$ M, entspricht 2 $\mu$ l Stammlösung auf 5ml Medium

Verdünnungsreihe: fortführend 0,5ml der Arbeitslösung auf jeweils 4,5ml Medium

Mit Ausnahme von Gefitinib (1:4) wurde für alle Inhibitoren eine 1:10 Verdünnungsreihe hergestellt. Hieraus ergeben sich die folgenden Konzentrationen für den Versuchsaufbau: 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 0,001 $\mu$ M, 0.0001 $\mu$ M. Alle Medikamente wurden in dreifacher Ausfertigung auf die Versuchsplatten pipettiert. Um zelltoxische Effekte des Lösungsmittels auszuschließen wurde DMSO gemäß der höchsten totalen Inhibitor-

Konzentration im Versuchsaufbau als Kontrolle verwendet. Bis zu den Auswertungen wurden die Versuchsplatten ohne weiteren Mediumwechsel inkubiert.

### **3.4.3 Auslesung der Vitalität**

72 Stunden nach Zugabe der Inhibitoren wurden die Platten vorsichtig abgesaugt und mit Resazurin-Lösung befüllt. Zur Herstellung einer 10X-Stammlösung müssen 7,5mg Resazurin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) in 50ml zweifach destilliertem Wasser gelöst werden. Der wasserlösliche, blaue Farbstoff Resazurin wird von funktionsfähigen Zellen irreversibel zu Resorufin reduziert, welches rot fluoresziert. In der Regel können die Platten nach einer Inkubationszeit von 2-4 Stunden bei 37°C ausgelesen werden. Die gemessenen Fluoreszenzwerte (Extinktion 530 / Emission 590) verhalten sich proportional zum Zellüberleben und entsprechen der noch vorhandenen metabolischen Aktivität der vitalen Zellen im Well. Mit Hilfe der Software Graphpad Prism konnten Überlebenskurven visualisiert werden und anhand der IC50 Werte die Sensitivität gegenüber den Inhibitoren bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um die mittlere inhibitorische Konzentration, also die Konzentration des Medikaments, bei der definitionsgemäß die halbmaximale Hemmung des Zellwachstums beobachtet wird.

### **3.4.4 Apoptose**

Da die Auswertung der Apoptose bereits 24 Stunden nach Medikamentenzugabe erfolgt, musste in diesem Versuchsaufbau die doppelte Anzahl an Zellen gesät werden ( $4 \times 10^3$  Zellen/Well). Im Gegensatz zu den Vitalitäts-Tests wurden hier statt des Resazurins drei Färbelösungen aus dem Vybrant Cell Death Kit (Invitrogen) verwendet: Yo-Pro®-1 (grün fluoreszierend, spätaoptotische Zellen), Propidiumiodid (rot fluoreszierend, nekrotische Zellen), Hoechst 33342 (grün fluoreszierend, kondensiertes Chromatin in frühapoptotischen Zellen). Die Lösungen wurden auch hier direkt nach Absaugen des Mediums hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert, dann in den Wells belassen und im Fluoreszenzmikroskop ausgelesen (ImageXpress® Micro System).

### **3.4.5 Western Blot**

Das Verfahren des Western Blot ermöglicht nach Auftrennung der Proteinfractionen in der Gelelektrophorese einen spezifischen Proteinnachweis mittels Antigen-Antikörper-Komplexbildung.

### 3.4.5.1 Antikörper

Antikörper		Source	kDa	Verdünnung	Sequenz
Phospho-EGF Receptor XP® (Tyr1068)	D7A5	Rabbit IgG	175	1:1000	Cell Signaling #3777S
EGF Receptor XP®	D38B1	Rabbit IgG	175	1:1000	Cell Signaling #4267S
Phospho-Akt (Thr308)	C31E5E	Rabbit IgG	60	1:1000	Cell Signaling #2965S
Phospho-Akt (Ser473)	193H12	Rabbit IgG	60	1:1000	Cell Signaling #4058
Akt (pan)	40D4	Mouse IgG1	60	1:2000	Cell Signaling #2920S
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	D13.14.4E	Rabbit IgG	44,42	1:2000	Cell Signaling #4370S
p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	L34F12	Mouse IgG1	44,42	1:2000	Cell Signaling #4696S
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	236B4	Rabbit IgG	15-20	1:1000	Cell Signaling #2855S
4E-BP1	53H11	Rabbit IgG	15-20	1:1000	Cell Signaling #9644S
HRAS (C-20)		Rabbit polyclonal	21	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc. #sc-520
GAPDH XP®	D16H11	Rabbit IgG	37	1:1000	Cell Signaling #5174
alpha-Actinin (H-300)		Rabbit polyclonal	100	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc. #sc-15335

**Tabelle 3.6 Primäre Antikörper**

#### Sekundäre Antikörper (Li-cor Bioscience):

IRDye® 800CW Conjugated Goat polyclonal Anti-Rabbit IgG (1:15,000)

IRDye® 680LT Conjugated Donkey polyclonal Anti-Mouse IgG (1:20,000)

### 3.4.5.2 Proteinaufbereitung

Für die Proteinversuche wurden die Zelllinien in 100mm durchmessenden Petrischalen subkultiviert und am Folgetag für 1 Stunde mit dem gewünschten Inhibitor inkubiert (Konzentrationen: 10µM, 1µM, 0,1µM, 0,001µM). Zum Zeitpunkt des Versuchs sollte eine Konfluenz von etwa 70% erreicht sein. Bei dieser befinden sich die Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase). Nach



Absaugen des Mediums wurden die Petrischalen auf Eis gekühlt und zweifach mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Beträufeln mit 50-80µl Lysepuffer wurden die Zellen mit einem Zellkratzer aus der Petrischale abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß auf Eis gegeben und für 20 Minuten im Minutentakt gewirbelt. Dem Lysepuffer (RIPA Buffer, Boston Bio Products, USA) wurden Phosphataseinhibitor- und Proteaseinhibitor-Mischungen zugesetzt, um einen zelleigenen Proteinabbau während der Aufbereitung zu verhindern. Zur Entfernung von Zelltrümmern aus dem Homogenisat folgte die Zentrifugation der Proben auf 14000 rpm für 30 Minuten. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig und ohne das Pellet aufzuwirbeln in ein neues Gefäß pipettiert und nach Proteinbestimmung auf -80°C gelagert.

#### **3.4.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung nach Bradford bedient sich dem Triphenylmethanfarbstoff Comassie-Brilliant-Blau G250, welcher nach Bindung an Proteine sein Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm ändert. Anhand einer Rinderalbumin (BSA)-Standardkurve können die Proteinkonzentrationen der Lysate errechnet werden. Alle Proben und Standardlösungen wurden hierfür in dreifacher Ausführung in eine 96-Well Platte pipettiert und anschließend im Fluoreszenzspektroskop ausgelesen.

#### **3.4.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Transfer**

Für die Präparation eines kontinuierlichen Polyacrylamid Gels wurden 60µl einer frisch angefertigten 10%igen APS-Lösung mit 6µl TEMED und 10 ml der Fertiglösung „Smart™ Gel 10%“ (Invitrogen) unter sanftem Schwanken vermischt und als Mini-Gel gegossen. Der Kamm für die Taschen wurde anschließend in das Trenngel eingebracht. Anhand der ermittelten Proteinkonzentrationen wurden die Lysate mit bi-distilliertem Wasser und 4X Ladepuffer (4%iger SDS-Puffer, #928-40004, Li-cor Bioscience) so zu einem Endvolumen von 40µl verdünnt, dass die verschiedenen Lysate mit jeweils gleicher Proteinkonzentration in die Taschen geladen werden konnten. Zur vollständigen Denaturierung mussten die Proben gewirbelt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt werden. Unter Verwendung des dazugehörigen *Smart™ Gel Running Buffer* 20X wurden die Gele in eine puffergefüllte Mini-Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad, Life-Science Group, USA) gegeben und nach vorsichtigem Entfernen der Kämme und Ausspülen der Taschen konnten die Lysate aufgetragen werden. Als Referenzwert für die Proteinmasse wurde in der ersten Tasche 5µl einer Proteinleiter geladen (*EZ-Run™ Pre-Stained Rec Protein Ladder*, Fisher BioReagents,

USA). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120V für etwa 60 Minuten durchgeführt, bis die Markerfarbe des Ladepuffers unten aus dem Gel austrat.

#### **3.4.5.5 Proteintransfer**

Nach Auftrennung der Proteinbanden wurden die Gele zwischen Schwämmen und Filterpapier so auf Nitrocellulosemembranen (Bio-Rad) positioniert, dass unter gleichmäßigem, leichtem Druck ein sauberer Transfer der Proteine auf die Trägermembran stattfinden konnte. Die Transferkammer (*Trans-Blot Semi-Wet Transfer Cell*; Bio-Rad) wurde mit Transferpuffer (10% 10X Transferpuffer (Bio-Rad), 20% Methanol, 70% bidestilliertes Wasser) gefüllt und für 3 Stunden bei 18V betrieben.

#### **3.4.5.6 Inkubation der Antikörper, Proteindetektion**

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen wurden die Membranen anschließend für eine Stunde mit Odyssey Blocking-Puffer gewaschen. Primäre und sekundäre Antikörper wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mit Blocking-Puffer verdünnt und konnten im Regelfall für 5-10 Detektionen verwendet werden. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte auf einem Rüttler für 4 Stunden bei Raumtemperatur, alternativ bei 4°C über Nacht. Die Membranen wurden von unspezifisch gebundenen Antikörpern durch drei 10-minütige Waschgänge mit TBST (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1% Tween 20) bereinigt. Nach 45-minütiger Inkubation der lichtsensitiven Sekundärantikörper in Dunkelheit bei Raumtemperatur und erneutem Waschen der Membran mit TBST (3x10 Minuten), konnten die Proteinbanden im Odyssey® Infrared Imaging System detektiert und mit der dazugehörigen Software ausgewertet werden.

### **3.5 Klonierung und Transfektion der HRAS-Mutation G12D**

In diesem Versuch sollte die Punktmutation (G12D) des Kodons 12 des HRAS-Gens der Tumorzelllinie HN4 isoliert, kloniert und transient in eine nicht mutierte Zelllinie transfiziert werden.

#### **3.5.1 Isolation und Amplifikation der G12D Mutation**

Nach RNA Extraktion (Illustra Triple Prep Kit, GE Healthcare, gemäß Protokoll) und RNA-Qualitätskontrolle (RNA-Integrität) folgte die cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation des relevanten DNA-Abschnittes (SuperScript<sup>TM</sup> III First Strand Synthesis

System for RT-PCR, Invitrogen). Für die cDNA-Synthese wurden zunächst RNA, Oligo(dT)-Primer und dNTPs für 5 Minuten auf 65°C inkubiert, für 1 Minute auf Eis gekühlt und anschließend unter Zugabe des cDNA-Synthese-Mix (2µl 10X *RT Buffer*, 4µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2µl 0,1M DTT, 1µl *RNaseOUT*<sup>™</sup>, 1µl *SuperScript*<sup>™</sup>III *RT*) für 50 Minuten auf 50°C und 5 Minuten auf 85°C inkubiert. Zur Entfernung von RNA-Resten wurden eine 20-minütige Inkubation mit 1µl RNaseH bei 37°C durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden Vorwärts- und Rückwärts-Primer für HRAS designt, welche mit den Sequenzen Xho1 bzw. Not1 der Restriktionsendonukleasen ausgestattet sind (HRAS-xho-Fwd: 5'-CTCGAGGCGATGACGGAATATAAGCTG-3', HRAS-not1-Rev: 5'-GCGGCCGCTCAGGAGAGCACACTTGC-3'). Um eine erfolgreiche RT-PCR zu verifizieren wurde die Sequenz gelelektrophoretisch nachgewiesen und anschließend auf die Mutation sequenziert.

### 3.5.2 Gateway-Klonierung

Die Klonierung mit Hilfe der Gateway® - Technologie ermöglicht eine schnelle und erfolgreiche Klonierung des PCR Produkts. Hierfür wurde das TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) verwendet, welches den aktiven Klonierungsvektor pCR®4-TOPO® enthält. Der Ligationsansatz (1,5µl des PCR-Produktes, 1µl Salzlösung, 1,5µl steriles Wasser und 1µl TOPO® Vektor) wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Gemäß Protokoll wurden die ONE SHOT® TOP 10 Zellen (kompetente E.coli Bakterien) am Folgetag mit dem TOPO® Plasmid transformiert. 2µl der Ligationslösung wurden hierfür vorsichtig mit den E.coli-Zellen vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend im Wasserbad einem Wärmeschock ausgesetzt, auf Eis abgekühlt, in SOC-Medium suspendiert und für eine Stunde bei 37°C und horizontaler Rotation inkubiert. Zur Selektion wurden die transformierten Bakterien mit Ampicillin-Resistenz kodierendem Vektor auf Ampicillin-XGal-Agar-Platten (0,001% Ampicillin, 30µl X-Gal, L-2897 Agar-Pulver Sigma Aldrich) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Fraktionierte Verdünnungsausstriche von weißen Kolonien wurden für eine weitere Nacht bei 37°C inkubiert. Die positiven Kolonien erscheinen weiß, da bei erfolgreicher Ligation der PCR-Fragmente in den Vektor die Gensequenz der beta-Galaktosidase unterbrochen wird, welche normalerweise das beigesetzte X-Gal spalten kann und die Blaufärbung hervorruft. Eine Auswahl von positiven Kolonien wurde mittels PCR und Sequenzierung auf das Vorhandensein der Mutation überprüft, bevor ein Klon mit nachgewiesener G12D-Mutation in Flüssigmedium kultiviert wurde (L-3022 Pulver für LB-Medium, Sigma Aldrich).

### 3.5.3 Isolation der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Quiagen) isoliert und in 30µl *Hypure Molecular Biology Grade* Wasser (Thermo scientific) eluiert.

### 3.5.4 Restriktionsverdau und Gelextraktion der Plasmid-DNA

Mit den Restriktionsendonukleasen Xho1 und Not1 wurde dann die klonierte Gensequenz aus den Plasmiden gelöst. Hierfür wurden 50µl der isolierten Plasmid-DNA-Lösung mit 2µl Xho1, 2µl Not1, 10µl 10X Puffer und 36µl Milli-Q Wasser vermischt und für 3 Stunden in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Die Verdauungsreaktion wurde dann in ein Agarose-Gel geladen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Bei kurzer UV-Durchleuchtung wurde die Bande dargestellt und mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Gemäß den Herstellerangaben wurden die klonierten HRAS-G12D-Fragmente dann mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) extrahiert.

### 3.5.5 Ligation mit Expressionsvektor pCI-neo

Für die Ligation der HRAS-G12D-Fragmente mit dem Expressionsvektor pCI-neo wurde ein Ligationsansatz (1µl pCI-neo-Vektor, 6µl HRAS-G12D-Lösung, 1µl 10X Puffer, 1µl Milli-Q Wasser, 1µl Ligase) für 48 Stunden inkubiert. Auch dieser Vektor wurde zum Zwecke der schnellen Vervielfachung entsprechend 3.5.2. in die ONE SHOT® TOP 10 Zellen transformiert. Auch hier wurde nach Verifizierung der G12D-Mutation ein Klon über Nacht kultiviert und pelletiert.

### 3.5.6 Endotoxinfreie Plasmid-Extraktion

Endotoxine sind Zellmembrankomponenten von Gram-negativen Bakterien wie z.B. E.coli. Während der Plasmidextraktion können diese freigesetzt werden und anschließend die Effektivität einer Transfektion deutlich herabsetzen. Aus diesem Grund wurde eine endotoxinfreie Plasmid-Extraktion durchgeführt. Gemäß Protokoll wurde hierfür das *PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit* (Life Technologies) verwendet.

### 3.5.7 Transiente Transfektion

Zur transienten Transfektion von HRAS-Wildtyp-Zellen (SCC9) mit dem G12D-HRAS-Plasmid wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 24-well-Platten ausgesät, so dass diese am Folgetag eine Konfluenz von etwa 50-70% erreicht hatten. 24 Stunden nach Aussaat wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Gemäß Protokoll wurde dann das *TransIT®-LT1*

*Tranfection Reagent* (Mirus Bio LLC, USA) mit der G12D-Plasmid-DNA und dem empfohlenen Medium vorsichtig vermischt und für 30 Minuten inkubiert. Ein Verhältnis von Reagenz zu Plasmid von 3:1 zeigte die beste Wirkung. Die Suspension wurde vorsichtig in die Wells getropft und durch leichtes Kreisen gleichmäßig im Medium vermischt. Als Positivkontrolle der Transfektion wurde ein GFP (Grün Fluoreszierendes Protein)-Vektor eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 40-50 Stunden und positiven Transfektionskontrollen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 72 Stunden mit dem Inhibitor Gefitinib inkubiert (10µM, 5µM, 1µM, 0.1µM). Anschließend wurde ein Vitalitätstest mit Resazurin durchgeführt (siehe 3.4.3).

### 3.6 Software zur Datenauswertung

- **Odyssey® 3.0** (Li-COR, USA)

Die Software wurde mit dem Odyssey® Infrared Imaging System bereitgestellt und zum Auslesen und Auswerten der Proteinlevel von Western Blot Membranen und der Zellviabilität bei Syto®60-Färbungen angewandt.

- **GraphPad Prism 5** (GraphPad Software Inc., USA)

Die Software wurde zur Berechnung der IC50-Werte (Zellviabilität) und Erstellung der zugehörigen Graphen verwendet.

- **Codon Code Aligner** (Codon Code Corp., USA)

Die Software wurde zur Analyse der Sequenzierungsergebnisse und Erstellung von Chromatogrammen verwendet.

- **Calculusyn Version 2.0** (Biosoft®, Cambridge, UK)

Die Software wurde zur Analyse der CI (ED90)-Werte und Erstellung der Dosis-Wirkungskurven bei kombinierten Inhibitor-Effekten verwendet

### **3.7 Statistische Analyse**

Die Signifikanzen wurden als Varianzanalyse mit Messwiederholung im balancierten Modell berechnet (ANOVA, *Analysis of Variance Model*). Mit Prüfgrößen wurde getestet, ob die Varianz zwischen den verschiedenen Inhibitoren größer ist als die Varianz innerhalb einer Substanz. Dadurch kann ermittelt werden, ob sich die Inhibitoren signifikant unterscheiden. Die statistische Signifikanz definiert sich als  $p < 0.005$ . Die Werte lagen für jeden Inhibitor in neunfacher Ausführung vor (3x Triplikat).

## 4 ERGEBNISSE

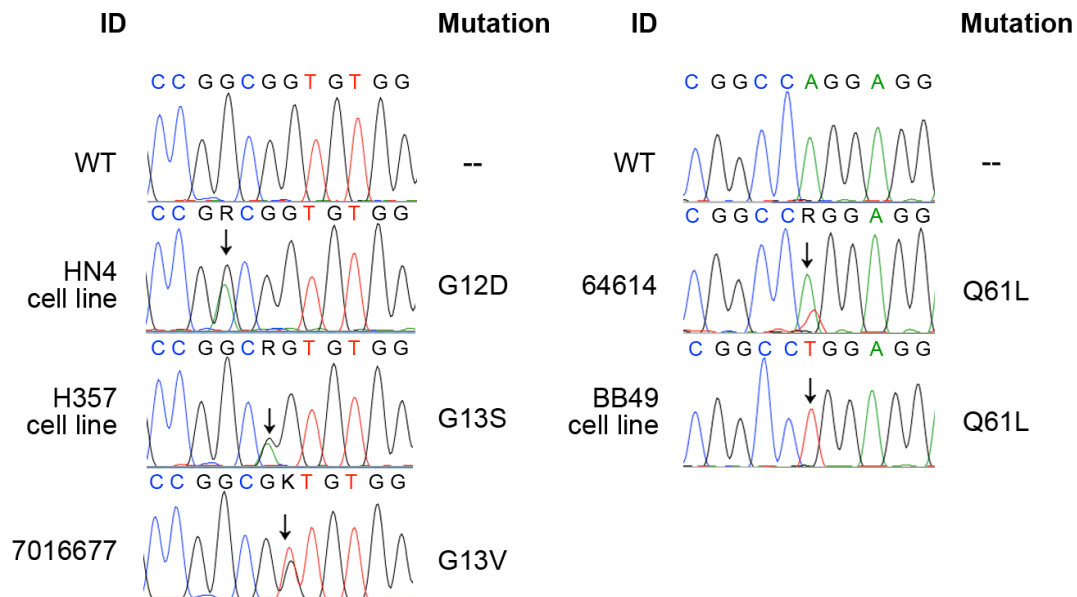
In der vorliegenden Studie wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um den Stellenwert von HRAS-Mutationen in plattenepithelialen Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) zu analysieren. Hierbei wurden schwerpunktmäßig das Ansprechen und die Reaktionsmechanismen mutierter Zelllinien gegenüber angewandten und neuen Therapieoptionen analysiert.

### 4.1 Screening von HNSCC Tumorzellen und Gewebeproben auf Mutationen in HRAS

Genetische Analysen von Kopf-Hals-Tumoren haben gezeigt, dass Mutationen im HRAS-Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 5% auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die HRAS-Hotspots im Kodon 12 und 13 (Exon 1) sowie Kodon 61 (Exon 2) von insgesamt 49 HNSCC-Zelllinien und 52 HNSCC-Gewebeproben mittels PCR amplifiziert und auf Veränderungen im DNA-Strang untersucht. Insgesamt konnten 5 Missense-Mutationen nachgewiesen werden, davon 3 in 49 Zelllinien (HN4, BB49 und H357) und 2 in 52 Gewebeproben. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 6,1% bzw. 3,6%.

In der Zelllinie HN4 fand sich eine Guanin-Adenin-Transition in der mittleren Position des 12. Kodons (c.35G>A), die zu einem Austausch der Aminosäure Glycin mit Aspartat (p.G12D) führt. In der Zelllinie H357 fand sich ebenfalls eine Guanin-Adenin-Transition, hier jedoch in der ersten Base des Kodons 13 (c.37G>A), die einen Austausch des Glycins mit Serin (p.G13S) nach sich zieht. Eine weitere Mutation im Kodon 13 (c.38G>T) konnte in der Gewebeprobe #7016677 ermittelt werden. Hier fand ein Austausch des Glycins mit Valin (p.G13V) statt. Die gut beschriebene Hotspot-Mutation p.Q61L, die Glutamin durch die Aminosäure Leucin ersetzt, wurde an der mittleren Base des Kodons 61 (c.182A>T) in der Gewebeprobe #64614 und der Zelllinie BB49 detektiert. Das Chromatogramm in Abbildung 4.1 zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung nochmals im Überblick.

## Mutationen in *HRAS*



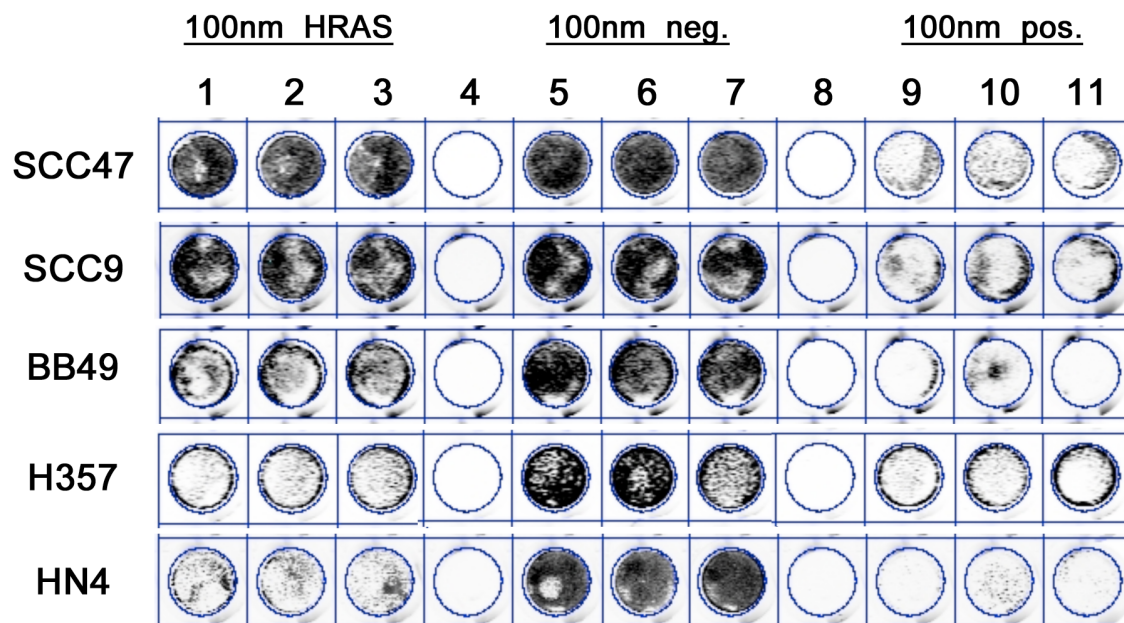
**Abb. 4.1 Chromatogramm:** Nachweis von *HRAS*-Mutationen in den Zelllinien HN4 (G12D), H357 (G13S), BB49 (Q61L) und den Gewebeproben #64614 (Q61L) und #7016677 (G13V). Als Referenz sind in der oberen Reihe die Wildtyp-Sequenzen und darunterliegend die Transitionen / Transversionen (schwarze Pfeile) dargestellt.

### 4.2 Effekte des *HRAS* Knockdowns in mutierten Zelllinien

Die Bedeutung der *HRAS*-Mutationen für Zellwachstum und -überleben in HNSCC sollte zunächst durch gezielte Ausschaltung der *HRAS*-Expression mittels RNA-Interferenz untersucht werden. Bei diesem Prinzip der posttranskriptionalen Genunterdrückung binden Antisense-RNA-Sequenzen komplementär an die transkribierte „messenger“ RNA (mRNA) des jeweiligen Gens und unterdrücken die Translation (Proteinsynthese) des Zielproteins. Zum direkten Vergleich wurden neben den mutierten Zelllinien HN4, BB49 und H357 zwei nicht mutierte Kontroll-Zelllinien transfiziert und das Zellüberleben mittels Fluoreszenzanfärbung der DNA (Syto60®) analysiert. Als Kontroll-Zelllinien wurden SCC47 und SCC9 ausgewählt, da in diesen keine Mutationen in den Hotspot-Regionen von *HRAS* nachgewiesen werden konnten. Der Knockdown wurde mit mindestens einer Wiederholung in je dreifacher Ausfertigung durchgeführt (n=6). Die Resultate wurden in der Auswertung nur berücksichtigt, wenn ein Zellüberleben der Negativkontrolle im Vergleich zu unbehandelten Zellen von mindestens 80% gewährleistet war. Eine Vitalität der Negativkontrolle von < 80% kann



ein Hinweis auf ein hohes Zellsterben aufgrund der Transfektionsmethode oder der verwendeten Reagenzien sein. Hingegen sprechen hohe Zelltoderaten in den Positivkontrollen für eine gute Transfektionseffizienz.

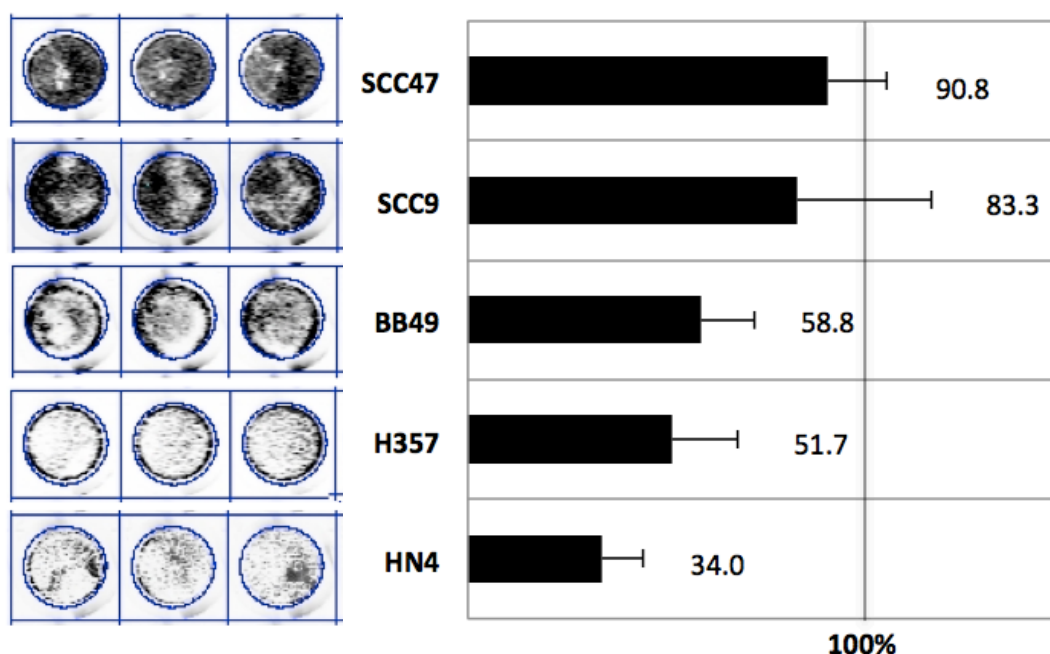


**Abb. 4.2 HRAS-knockdown in HNSCC Zelllinien.** Dargestellt sind die Zelllinien SCC47, SCC9, BB49, H357 und HN4 nach RNA-Interferenz und anschließender Syto60®-Färbung. Jede Zelllinie wurde jeweils in dreifacher Ausfertigung mit HRAS-spezifischer siRNA, der Negativkontrolle NC1 und einer Positivkontrolle transfiziert. Durch das Anfärben der Nukleinsäuren (schwarz) lässt sich das Ausmaß des Zellüberlebens visuell darstellen. Die Positivkontrollen (Spalte 9-11) zeigen wenig anfärbare Zellen und sprechen für eine erfolgreiche Transfektion (= hohes Zellsterben). Die Negativkontrolle (Spalte 5-7) zeigt wie erwartet ein sehr dichtes Zellwachstum. Bei der Unterdrückung der HRAS-Expression (Spalte 1-3) zeigen sich deutliche Differenzen zwischen den Zelllinien.

Abbildung 4.2 liefert eine ausschnittsweise Zusammenstellung ausgelesener 96-Well-Platten der verschiedenen Zelllinien nach Transfektion und Anfärben intrazellulärer DNA. Die Spalten 1-3 zeigen hierbei die HRAS-transfizierten Wells und vermitteln eindrücklich die Tendenz, dass die mutierten Zellen (BB49, H357, HN4) ein deutlich reduziertes Zellüberleben aufweisen, während die Kontroll-Zelllinien (SCC47, SCC9) ähnlich der jeweiligen Negativkontrollen (NC1, Spalte 4-7) wachsen. Die Positivkontrollen (Spalte 9-11) zeigen durchwegs hohe Zelltoderaten in Form von wenig anfärbbarer DNA und lassen auf eine, für die verwendeten Zellen, erfolgreiche Transfektionsmethode schließen. Um transfektionsbedingte Einflüsse auf das Zellwachstumsverhalten auszuschließen, wurden die Ergebnisse der

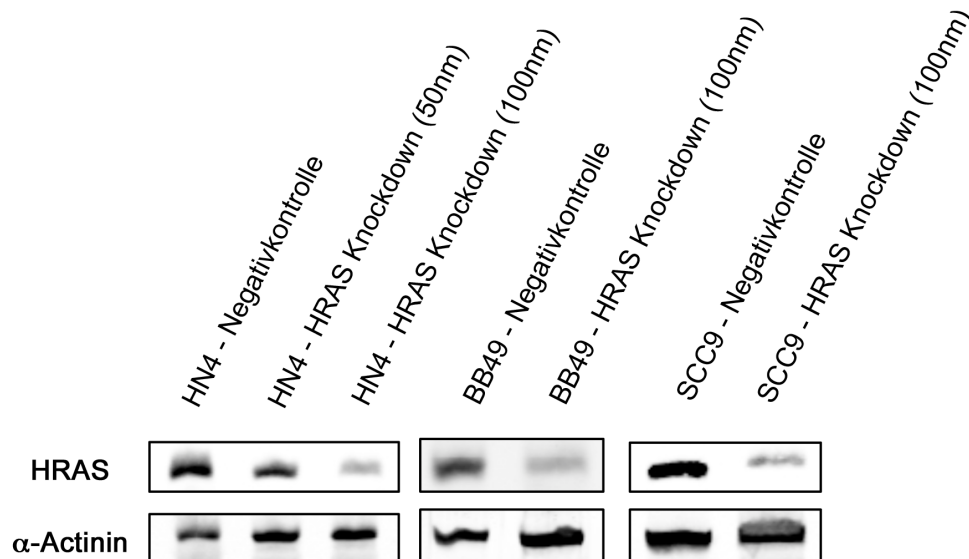
Fluoreszenzmessung in Relation zu den Negativkontrollen gesetzt. Die Negativkontrollen wurden dementsprechend als 100 %iges Zellüberleben gewertet.

Die ausgelesenen Fluoreszenzlevel nach Syto60®-Färbung bestätigen den visuellen Eindruck der Zelldichte in den Wells (s. Abb. 4.3). Die Zellüberlebensraten der mutierten Zelllinien betrugen 34,0% (HN4), 51,7% (H357) und 58,8% (BB49). Im Gegensatz dazu waren SCC47 und SCC9 mit 90,8% und 83,3% durch den HRAS Knockdown nur gering in ihrem Wachstumsverhalten beeinflusst. Die stark erniedrigten Überlebens- bzw. Wachstumsraten der Mutanten geben erste Hinweise darauf, dass Mutationen in HRAS vermutlich fördernd auf Wachstum und Differenzierung der Krebszellen wirken.



**Abb. 4.3 Auswertung des Zellüberlebens nach HRAS-Knockdown in HNSCC-Zelllinien.** Neben dem ausschnittsweise dargestellten HRAS Knockdown zeigt das Balkendiagramm die prozentualen Überlebensraten der Zelllinien mit Standardabweichung. Die Werte wurden anhand von Fluoreszenzmessungen der Syto60®-Färbung ermittelt.

Zum Nachweis reduzierter HRAS-Proteinlevel nach RNA-Interferenz wurde in den Zelllinien HN4, BB49 und SCC9 exemplarisch ein Western Blot angefertigt. Diese belegen anhand der deutlich abgeschwächten HRAS-Expressionslevel bei 100nM HRAS-Knockdown mit konstanten Ladekontrollen ( $\alpha$ -Actinin) eine erfolgreiche Suppression des Proteins (s. Abb. 4.4).

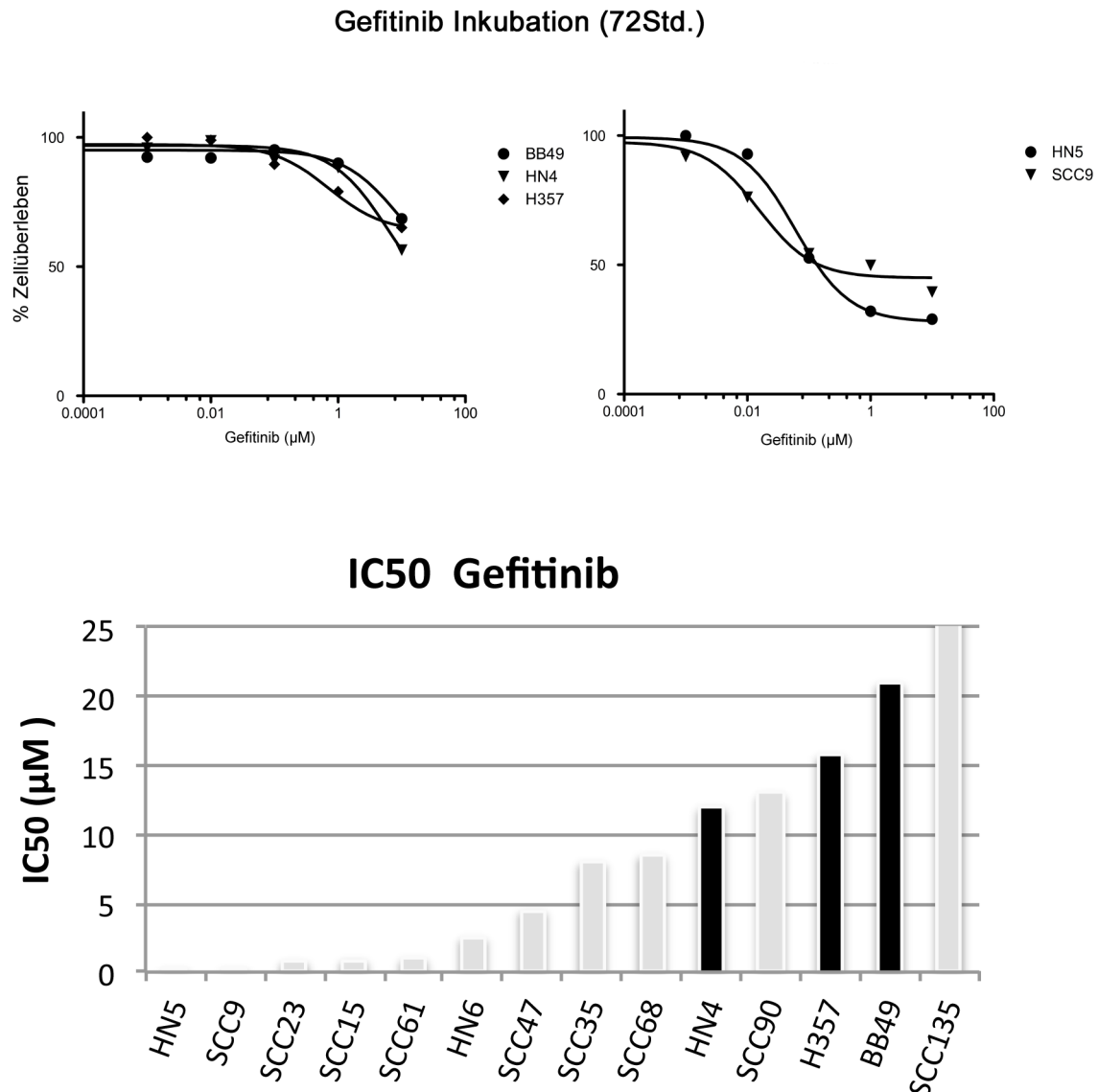


**Abb. 4.4 HRAS-Proteinlevel nach Knockdown in HNSCC Zelllinien.** Die hier dargestellten Western Blot Membranen zeigen in der oberen Reihe das Protein HRAS und in der unteren Reihe die Ladekontrolle alpha-Actinin. Bei der HRAS-spezifischen RNA-Interferenz mit 100nM siRNA (Spalte 3, 5 und 7) zeigt sich die erfolgreiche Unterdrückung der Genexpression anhand der abgeschwächten Proteinbanden bei konstanten Ladekontrollen.

### 4.3 HRAS-Mutationen induzieren Resistenz gegen EGFR-Inhibitoren

#### 4.3.1 Resistenzlevel verschiedener Zelllinien

Um das schlechte Ansprechen der Kopf-Hals-Tumore auf den EGFR-Inhibitor Cetuximab zu untersuchen, wurden 14 Zelllinien mit aufsteigenden Konzentrationen (0,01 bis 10  $\mu\text{M}$ ) des Tyrosinkinase-Inhibitors Gefitinib inkubiert. Zur Quantifizierung der Sensitivität der Zelllinien gegenüber den Pharmazeutika wurde die mittlere inhibitorische Konzentration  $\text{IC}_{50}$  ermittelt. Insgesamt zeigten sich in 10 der 14 Zelllinien (71,5%)  $\text{IC}_{50}$  Werte  $\geq 1\mu\text{M}$ , was für eine mäßig- bis hochgradige Resistenz spricht und auf Zellebene die beobachtete therapeutische Problematik des klinischen Alltags widerspiegelt. HN5 ( $\text{IC}_{50}$ : 0,2 $\mu\text{M}$ ), SCC9 ( $\text{IC}_{50}$ : 0,2 $\mu\text{M}$ ), SCC23 ( $\text{IC}_{50}$ : 0,8 $\mu\text{M}$ ) und SCC15 ( $\text{IC}_{50}$ : 0,9 $\mu\text{M}$ ) können als mäßiggradig sensitiv eingestuft werden, wohingegen sich die HRAS-mutierten Zelllinien mit  $\text{IC}_{50}$ -Werte von 21 $\mu\text{M}$  (BB49), 15,8 $\mu\text{M}$  (H357) und 12 $\mu\text{M}$  (HN4) hochgradig resistent gegenüber Gefitinib zeigten. Des Weiteren verzeichneten die Zelllinien SCC135, SCC90, SCC68 und SCC35 hohe Resistenzlevel (Abbildung 4.5).

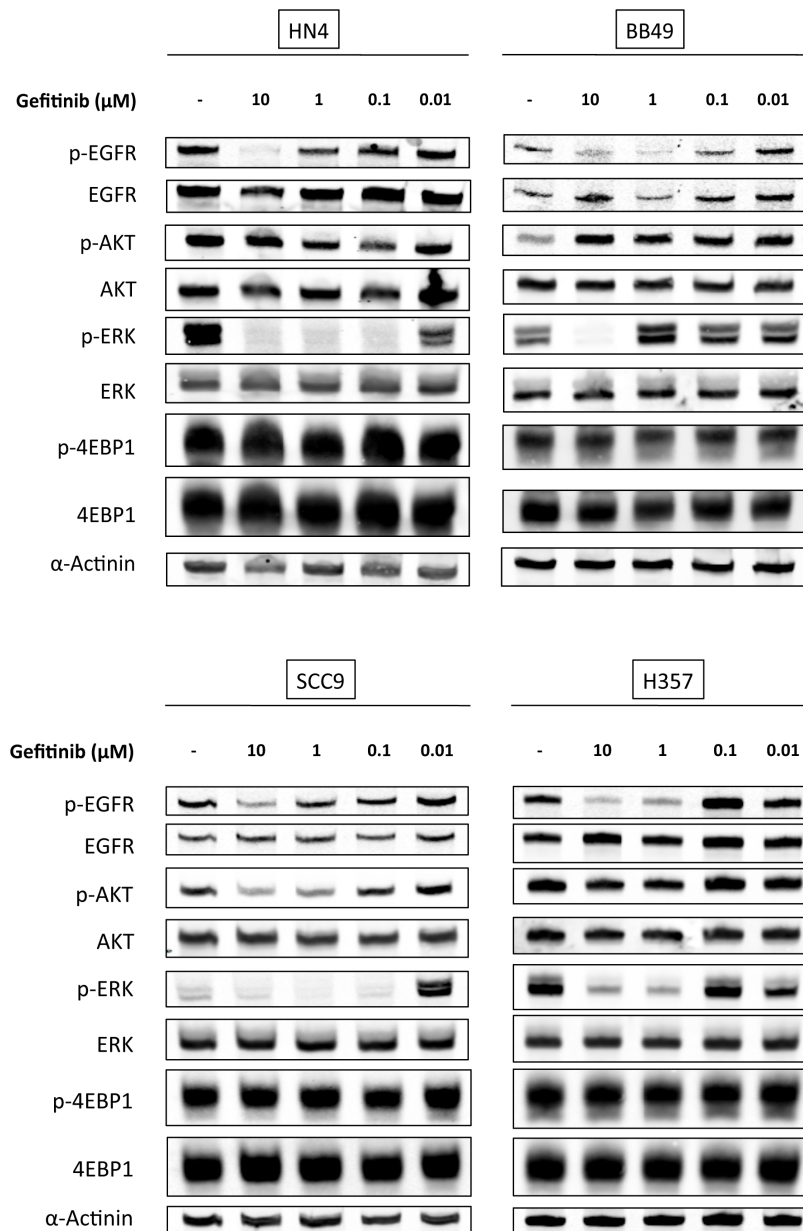


**Abb. 4.5 Resistenzlevel von HNSCC-Zelllinien gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib.** Die Graphen zeigen Dosis-Zellüberlebens-Kurven nach 72-stündiger Inkubation mit Gefitinib. Die Konzentration des Inhibitors ist auf der logarithmischen x-Achse, das prozentuale Zellüberleben auf der y-Achse aufgetragen. Die Gegenüberstellung verdeutlicht die unterschiedlichen Kurvenverläufe der HRAS-mutierten Zelllinien (links) und der sensitiven Zelllinien (rechts). Das Balkendiagramm zeigt die  $IC_{50}$ -Werte aller mit Gefitinib getesteten Zelllinien von der höchsten Sensitivität (links) zur höchsten Resistenz (rechts). Die HRAS-mutierten Zelllinien (schwarz) befinden sich unter den sehr resistenten HNSCC-Zellen.

#### 4.3.2 Effekte von Gefitinib auf die Hauptsignaltransduktionswege PI3K/Akt und Ras/Erk

Zur Beurteilung von möglichen Effekten des Inhibitors auf die nachgeschalteten Signaltransduktionswege wurden Zellen nach einstündiger Gefitinib-Behandlung lysiert und geblottet. Anhand dieser Blots sollte die Proteinphosphorylierung von

Schlüsselproteinen in den Hauptsignalkaskaden bestimmt werden (s. Abb. 4.6). Aufgrund seiner hohen Sensitivität gegenüber Gefitinib wurde SCC9 als Kontroll-Zelllinie herangezogen. Änderungen der Expressionslevel sind nach einstündiger Inkubation nicht zu erwarten, der Phosphorylierungsgrad zeigt jedoch die Aktivitätsschwankung der Zellproteine als Reaktion auf den Inhibitor an.

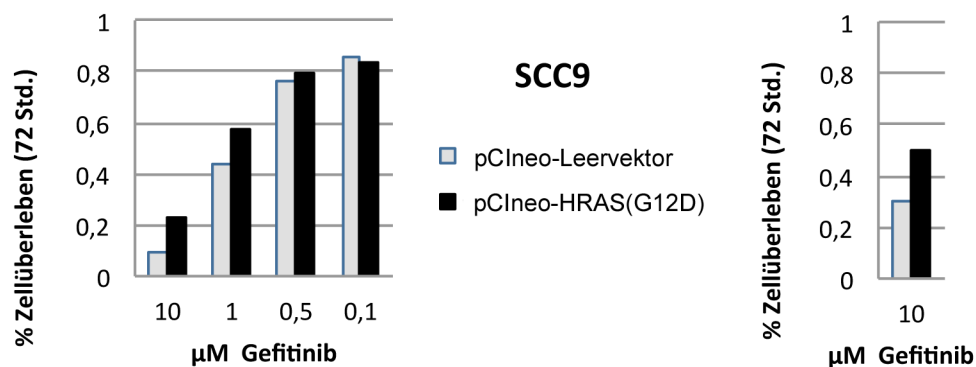


**Abb. 4.6 Western Blot der Zelllinien HN4, BB49, H357 und SCC9 nach einstündiger Inkubation mit Gefitinib.** Es werden die phosphorylierten „p-“ (aktiven) Proteinlevel in direktem Bezug zum jeweiligen Totalprotein dargestellt. Die Proteinbanden sind von links nach rechts nach absteigenden Gefitinib Konzentrationen (10μM – 0,01μM) angeordnet. An Position 1 ist immer ein unbehandeltes Zelllysate als Negativkontrolle geladen. Als Ladekontrolle wurde α-Actinin verwendet.

Gemäß unseren Erwartungen zeigte sich in allen vier Zelllinien bei Gefitinib-Konzentrationen  $\geq 0,1\mu\text{M}$  eine reduzierte Aktivität der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase, welche sich anhand erniedrigter p-EGFR Level darstellt. P-ERK bzw. p-Akt und p-4EBP1, als nachgeschaltete Proteine von Ras, spiegeln die beiden Hauptsignalwege Ras/Raf/Mek/Erk und Ras/PI3K/Akt wider. EGFR aktiviert im Regelfall beide Signalkaskaden, weshalb eine geminderte Aktivität von Akt und ERK zu erwarten ist. In unserer Kontroll-Zelllinie SCC9 ließen sich erniedrigte p-Akt und p-ERK Level bei Gefitinib-Konzentrationen  $\geq 1\mu\text{M}$  bzw.  $\geq 0,1\mu\text{M}$  beobachten. In ähnlichem Maße fand sich bei den mutierten Zelllinien eine Gefitinib-assoziierte Unterdrückung der p-ERK Level, wobei die Intensität zwischen den verschiedenen Mutanten schwankte. BB49, die sich in Vitalitätsversuchen als eine der resistentesten Zelllinien manifestierte, erreichte nur bei sehr hohen Konzentrationen von Gefitinib ( $10\mu\text{M}$ ) eine Suppression von p-Erk, was im Einklang mit den hohen  $\text{IC}_{50}$ -Werten der vorangegangenen Testergebnisse stand. Interessanterweise zeigten alle HRAS-Mutanten im Gegensatz zu SCC9 selbst bei höchster Konzentration des Inhibitors ( $10\mu\text{M}$ ) keine Unterdrückung der Akt-Aktivität. Die Resultate der Western Blots lassen vermuten, dass in diesem Fall der PI3K/Akt Signalweg unabhängig des EGF-Rezeptors aktiviert wird. Ein permanent aktives HRAS-Protein könnte diesem Aktivierungsprozess zugrunde liegen und würde unsere Hypothese, dass HRAS in HNSCC onkogenes Potenzial besitzt, festigen.

#### 4.3.3 Verhalten von HRAS-G12D-transfizierten Zellen bei EGFR-Inhibition

Um herauszufinden, ob eine Zelle, in die eine HRAS-Hotspot-Mutation eingeschleust wird, im Umkehrschluss an Sensitivität gegenüber Gefitinib einbüßt, erstellten wir den pCI-neo-HRAS(G12D)-Expressionsvektor zur Insertion in die Gefitinib-sensitive Zelllinie SCC9. Nach Verifizierung der G12D-Mutation im Vektor wurden die Zellen transient transfiziert und anschließend für 72 Stunden mit Gefitinib inkubiert. Entsprechend der Vitalitätsanalysen in 4.3.1 wurde das Zellüberleben in Korrelation zu den Leervektor-transfizierten Zellen errechnet. Abbildung 4.7 zeigt die Ergebnisse zweier individuell durchgeführter Transfektionen: Transfektion 1 mit anschließender Gefitinib-Inkubation mit den Konzentrationen  $10\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$ ,  $0,5\mu\text{M}$  und  $0,1\mu\text{M}$  sowie Transfektion 2 mit anschließender Gefitinib-Inkubation mit der Konzentration  $10\mu\text{M}$ . Die stärksten Effekte der Transfektion ließen sich bei Konzentrationen von 10 und  $1\mu\text{M}$  Gefitinib ausmachen. Hier zeigte sich eine klare Tendenz der Resistenzzunahme gegenüber dem EGFR-Inhibitor, also erhöhte Überlebensraten der G12D-transfizierten Zellen (schwarze Balken).



**Abb. 4.7 HRAS(G12D)-Transfektion.** Die beiden Grafiken zeigen nach einer Gefitinib-Inkubation von 72 Stunden das prozentuale Zellüberleben der HRAS(G12D)-transfizierten Zellen (schwarz) im direkten Vergleich mit den Leervektor-transfizierten Zellen (grau). Die Daten präsentieren das prozentuale Zellüberleben (Mittelwerte von Duplikaten) in Relation zu transfizierten, aber unbehandelten Kontrollzelllinien.

Das in Tabelle 4.1 aufgelistete prozentuale Zellüberleben der Versuchsreihe verdeutlicht den Überlebensvorteil der transfizierten Zellen. Bei einer Konzentration von 10µM Gefitinib überlebten 13,6% (Transfektion 1) bzw. 19,6% (Transfektion 2) mehr Zellen, als in der Leervektor-Transfektion. Auch bei einer Gefitinib-Konzentration von 1µM zeigten die Zellen einen Überlebensvorteil von 15,1%. Bei niedrigeren Konzentrationen wuchsen die Zellen annähernd gleich. Gefitinib konnte folglich das Zellwachstum der HRAS(G12D)-transfizierten Zellen deutlich schlechter hemmen, als das der Kontrollgruppe.

µM Gefitinib (72 Std.)	% Zellüberleben pCI-Neo-Leervektor	% Zellüberleben pCI-Neo-HRAS(G12D)	% Überlebens- Vorteil
10 (Transfektion 1)	9,7	23,3	13,6
10 (Transfektion 2)	30,0	49,6	19,6
1	44,4	59,5	15,1
0,5	76,7	79,4	2,7
0,1	86,0	85,8	0,2

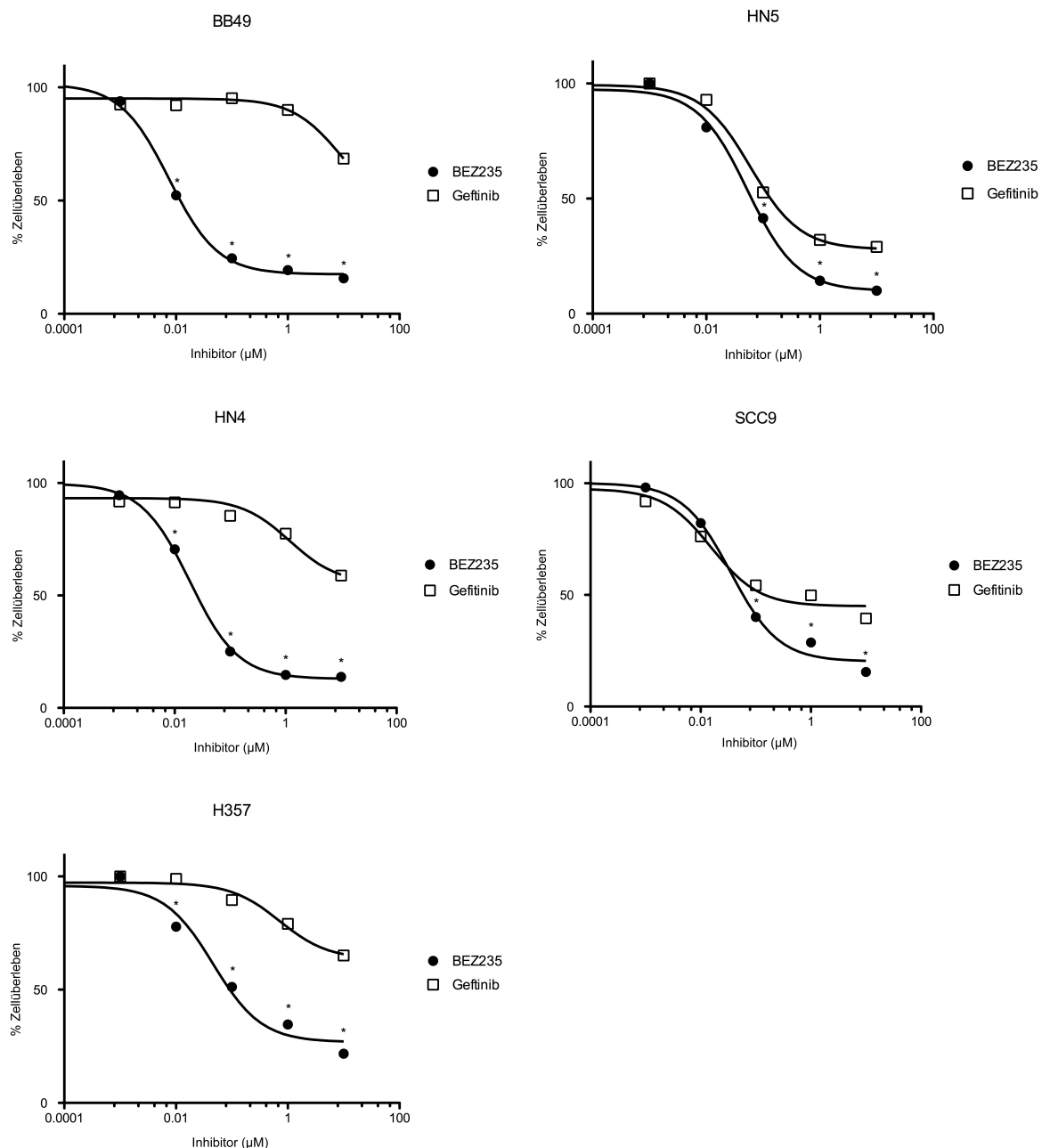
**Tabelle 4.1 Prozentualer Überlebensvorteil der HRAS(G12D)-transfizierten Zellen** gegenüber den Leervektor-transfizierten Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Gefitinib.



## 4.4 HRAS-Mutanten zeigen hohe Sensitivität gegenüber PI3K Inhibitoren

### 4.4.1 Zellvitalität bei Behandlung mit PI3K (+/- m-TOR) – Inhibitoren

Unter der Annahme, dass ein PI3K-abhängiges Zellwachstum in HRAS-mutierten Zellen vorliegt, sollte weitergehend überprüft werden, in welchem Ausmaß HNSCC-Zelllinien auf PI3K-Inhibitoren ansprechen.



**Abb. 4.8 Vitalitätskurven nach Gefitinib und BEZ-235 Inkubation.** Die Graphen zeigen die Dosis-Zellüberlebens-Kurven nach 72-stündiger Inkubation mit Gefitinib (weiße Quadrate) und dem PI3K-Inhibitor BEZ235 (schwarze Punkte). Die Konzentration des Inhibitors ist auf der logarithmischen X-Achse, das prozentuale Zellüberleben auf der y-Achse aufgetragen. Die Gegenüberstellung verdeutlicht die unterschiedlichen Kurvenverläufe bei PI3K bzw. EGFR-Inhibition der HRAS-mutierten Zelllinien BB49, HN4, H357 (links) und der HRAS-Wildtyp-Zelllinien SCC9 und HN5 (rechts). „\*“ entspricht  $p < 0.005$ .



In unserer Studie wurden Zellen für 72 Stunden mit den kombinierten pan-PI3K/mTOR-Inhibitoren NVP-BEZ235 und GDC-0980, sowie dem pan-PI3K-Inhibitor GDC-0941 mit aufsteigenden Konzentrationen von 0,001µM - 10µM inkubiert, um anschließend mittels Resazurin-Assay die IC<sub>50</sub>-Werte zu ermitteln. Abbildung 4.8 verdeutlicht in einer Gegenüberstellung die stark abweichenden Vitalitätskurven nach Gefitinib- und BEZ235-Inkubation. Die Mutanten BB49, HN4 und H357 zeigen im Vergleich zu den Kontrollen SCC9 und HN5 bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen von 0,01µM ein deutlich besseres Ansprechen auf die PI3K-Inhibition als dies beim EGFR-Inhibitor Gefitinib der Fall war. Die Ergebnisse spiegeln sich dementsprechend in sehr niedrigen IC<sub>50</sub>-Werten im nanomolaren Bereich wider. Die IC<sub>50</sub>-Werte für die BEZ235-Behandlung betrugen 0,014µM (BB49), 0,029µM (HN4), 0,139µM (H357).

	<b>BB49</b>	<b>HN4</b>	<b>H357</b>	<b>HN5</b>	<b>SCC9</b>
<b>IC<sub>50</sub> (Gefitinib)</b>	20,590	11,790	15,860	0,180	0,750
<b>IC<sub>50</sub> (BEZ235)</b>	0,014	0,029	0,139	0,069	0,078
<b>IC<sub>50</sub> (GDC-0980)</b>	0,181	0,298	-	0,587	0,294
<b>IC<sub>50</sub> (GDC-0941)</b>	0,679	0,727	-	1,417	0,410

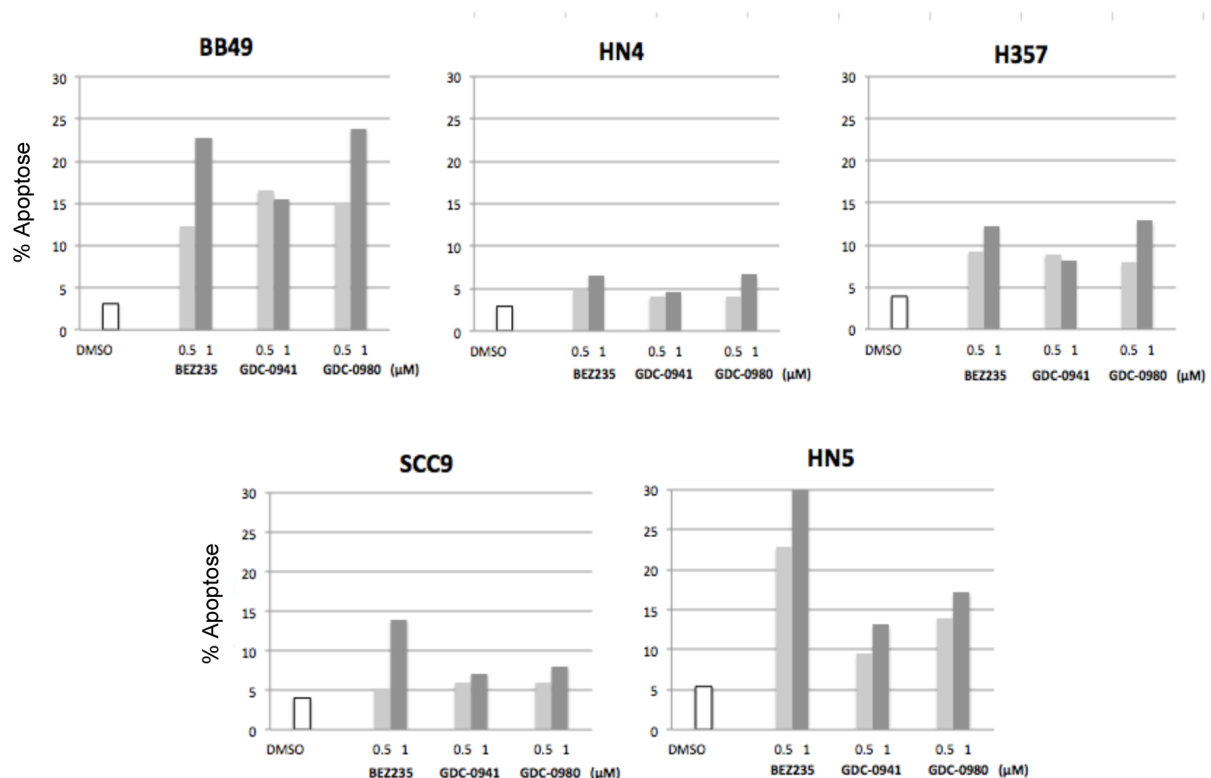
**Tab 4.2 Tabellarischer Überblick der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>)**  
 Aufgelistet sind die IC<sub>50</sub>-Werte der Zelllinien BB49 (Q61L), HN4 (G12D), H357 (G13V), HN5 und SCC9 bei Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib, dem PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ235, dem PI3K/mTOR-Inhibitor GDC-0980 und dem PI3K-Inhibitor GDC-0941

Tabelle 4.2 liefert die aus einer Vielzahl unabhängiger Versuchsreihen analysierten Mittelwerte der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>). Beim Vergleich der drei PI3K-Inhibitoren zeigte BEZ235 die niedrigsten IC<sub>50</sub>-Werte und somit die besten therapeutischen Effekte auf die Tumorzellen. Der deutliche therapeutische Vorteil von BEZ235 (IC<sub>50</sub> Level 0,01 - 0,08µM) verglichen mit GDC-0941 (IC<sub>50</sub> Level 0,4 - 0,7µM) könnte sich durch den zusätzlichen Angriffspunkt am mTOR-Proteinkomplex erklären. GDC-0980 (IC<sub>50</sub> Level 0,2 - 0,6µM), ebenfalls ein dualer Inhibitor, zeigte bessere Effekte als GDC-0941, aber deutlich schwächere als BEZ235. Interessanterweise ergab sich aus der Datenanalyse, dass SCC9 und HN5 ebenfalls, wenn auch nicht auf gleich

hohem Niveau wie die HRAS-Mutanten, sensitiv auf PI3K-Inhibitoren reagierten. Unter allen verwendeten Zelllinien zeigt sich im Vergleich zu den bislang eingesetzten EGFR-Inhibitoren bei Konzentrationen von 0,1µM, 1µM und 10µM eine signifikant höhere Sensitivität ( $p < 0.005$ ) gegenüber PI3K-Inhibitoren.

#### 4.4.2 Apoptoseinduktion

In Vitalitätstests ist generell nicht ersichtlich, ob eine Stagnation des Zellwachstums oder ein tatsächliches Zellsterben durch Eintritt in den natürlichen Zelltod (Apoptose) vorliegt. Folglich war es für uns von großem Interesse anhand von Apoptose-Assays den prozentualen Anteil der Zellen zu bestimmen, die sich nach Inkubation mit PI3K-Inhibitoren im Stadium der Apoptose befinden.



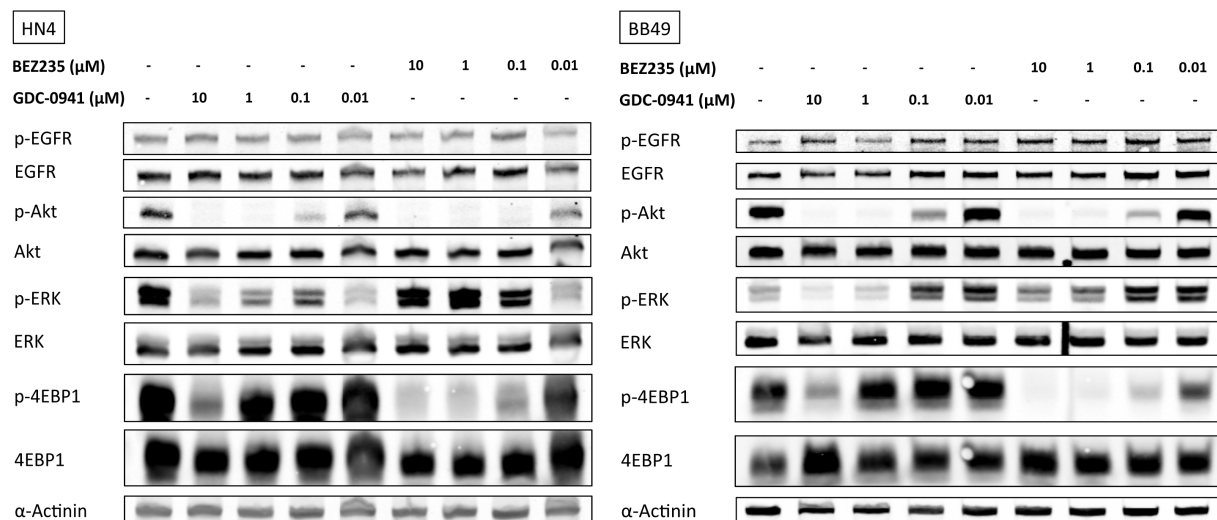
**Abb. 4.9 Apoptoseinduktion nach PI3K-Inhibition.** Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den PI3K-Inhibitoren BEZ235, GDC-0980 und GDC-0941 (jeweils 0,5 und 1 µM) behandelt und anschließend im Apoptose-Screening ausgewertet. Die Balken geben prozentual die totale Apoptoserate (früh- und spätapoptotische Marker) in der jeweiligen behandelten Zelllinie wieder. Alle Versuchsreihen lieferten höhere Apoptoselevel als in der DMSO-Kontrolle (3-5% Apoptose).

Mit Ausnahme von HN4 konnte in den getesteten Zelllinien eine Gesamtapoptose (Früh- und Spätapoptose) von 10 bis 30% nachgewiesen werden. Vergleicht man die

Gesamtapoptose mit Zellüberlebensraten bei gleichem Versuchsansatz (beispielsweise 1  $\mu$ M BEZ235), so zeigten sich im Einklang mit niedrigen Zellüberlebensraten von  $\leq 30\%$  sehr hohe Apoptoselevel von 12,2% (H357), 13,9% (SCC9), 22,8% (BB49) und 31,4% (HN5). Entsprechend den berechneten  $IC_{50}$ -Werten in Vitalitäts-Versuchen (Tabelle 4.2) zeigten sich konstant höhere Apoptoseraten durch die dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren (BEZ235, GDC-0980) im Vergleich zu dem PI3K-Inhibitor GDC-0941. Die generell beobachtete hohe Apoptoseinduktion in HNSCC-Tumorzellen bekräftigt unsere Annahme, dass der PI3K/Akt-Signalweg für die Tumorprogression eine entscheidende Rolle spielt.

#### 4.4.3 Effekte auf die Hauptsignaltransduktionswege PI3K/Akt und Ras/Erk bei PI3K-Inhibition

Auch nach kombinierter PI3K/mTOR- bzw. solitärer PI3K-Inhibition wurden Western Blots angefertigt, um einen Einblick in die Mechanismen der Signaltransduktion zu erlangen (Abbildung 4.10).



**Abb. 4.10 Western Blots der Zelllinien HN4 und BB49 nach einstündiger Inkubation mit BEZ235 und GDC-0941.** Es werden die phosphorylierten „p-“ (aktiven) Proteinlevel in direktem Bezug zum jeweiligen Totalprotein dargestellt. Die Proteinbanden sind in den Spalten von links nach rechts nach absteigenden Inhibitor-Konzentrationen (10  $\mu$ M – 0,01  $\mu$ M) angeordnet, in Spalte 1 ist immer ein unbehandeltes Zelllysate als Negativkontrolle geladen. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Actinin verwendet.

Wie erwartet zeigte sich keine Veränderung der p-EGFR Level, welche als vorangeschaltetes Protein der PI3-Kinase durch die Inhibitoren unbeeinflusst bleiben.

Entsprechend den hohen Sensitivitäten in Vitalitätstests, werden p-Akt und das nachgeschaltete p-4EBP1 durch beide Inhibitoren stark herunterreguliert. Hier zeigt sich, dass BEZ235 durch seine dualen Angriffspunkte an PI3K und mTOR die p-4EBP1 Level deutlich stärker beeinflusst. Während bei der Behandlung mit GDC-0941 Konzentrationen von 0,1µM und 1µM keinen Einfluss auf die Aktivität von p-4EBP1 zeigen, ist diese bei selbigen Konzentrationen von BEZ235 komplett unterdrückt. Dies würde erklären, warum die IC<sub>50</sub>-Werte von GDC-0941 um den Faktor 5 bis 50 höher, somit resistenter waren, als die nach Zugabe der effizienten Substanz BEZ235.

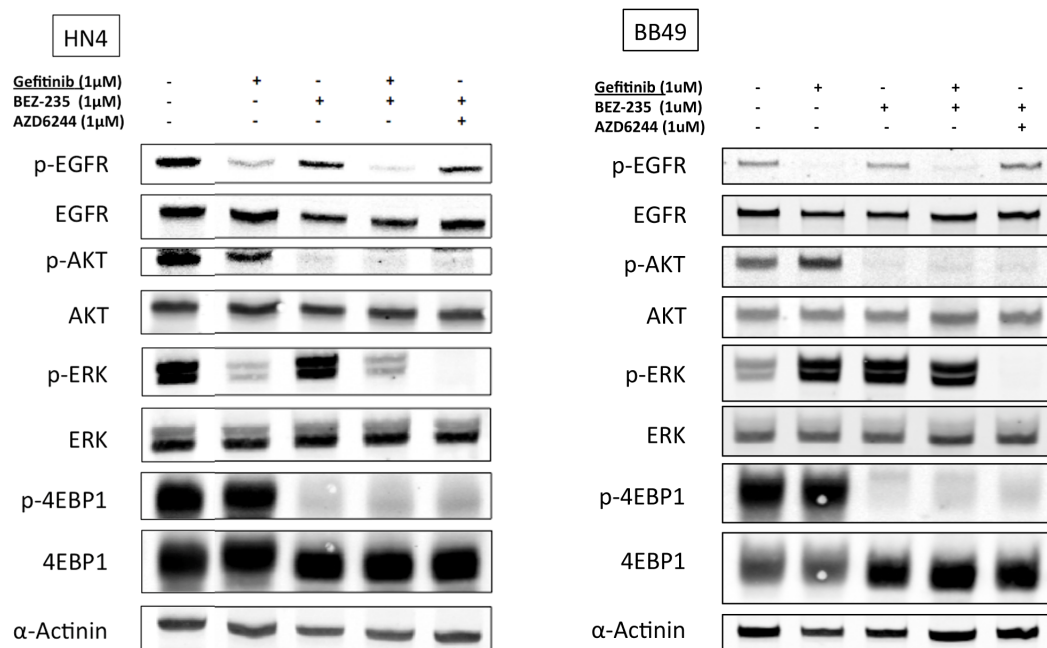
Überraschenderweise konnten neben p-Akt und p-4EBP1 in unterschiedlichem Ausmaß auch reduzierte Level von p-ERK detektiert werden. Demnach muss eine Beeinflussung des MEK/ERK-Signalweges durch die PI3K-Blockade oder durch eine unspezifische Reaktion des Inhibitors gegeben sein.

#### **4.5 Untersuchungen zu Kombinationen von PI3K-Inhibitoren mit EGFR- bzw. MEK-Inhibitoren**

##### **4.5.1 Effekte auf die Hauptsignaltransduktionswege PI3K/Akt und Ras/Erk**

Entsprechend den Analysen nach Behandlung mit einem einzelnen Inhibitor wurden exemplarisch die Zelllinien BB49 und HN4 mit Kombinationen aus den Inhibitoren BEZ235 (PI3K/mTOR) und Gefitinib (EGFR) oder BEZ235 und AZD6244 (MEK) inkubiert. Anhand von Western Blots (Abb. 4.11) wurde untersucht wie sich die phosphorylierten Proteinlevel nach kombinierten im direkten Vergleich zu den solitären Behandlungen verhalten. Es konnten zunächst für beide Zelllinien die Ergebnisse aus den 1µM Gefitinib und den 1µM BEZ235 Behandlungen aus vorangegangenen Versuchen verifiziert werden (vgl. Abb. 4.6 bzw. Abb. 4.10). Nach Kombination von PI3K/mTOR mit EGFR Inhibitoren (1µM BEZ235 + 1µM Gefitinib) zeigten sich in den Blots synergistische Effekte. In beiden Zelllinien konnten somit neben den reduzierten pAkt und p4EBP1-Leveln durch PI3K-Inhibition bei zusätzlicher Gabe von Gefitinib die pEGFR-Level reduziert werden. Entsprechend vorangegangener Ergebnisse konnte auch hier keine wesentliche Reduktion der MEK/ERK-Signalaktivität (Protein p-ERK) erreicht werden. Erst durch die Kombination des PI3K-Inhibitors mit einem MEK-Inhibitor zeigt sich eine deutlich reduzierte p-ERK-Bande neben der reduzierten

Akt-mTOR-Achse (p-AKT/p-4EBP1), was für eine erfolgreiche Suppression beider Hauptsignalwege spricht.

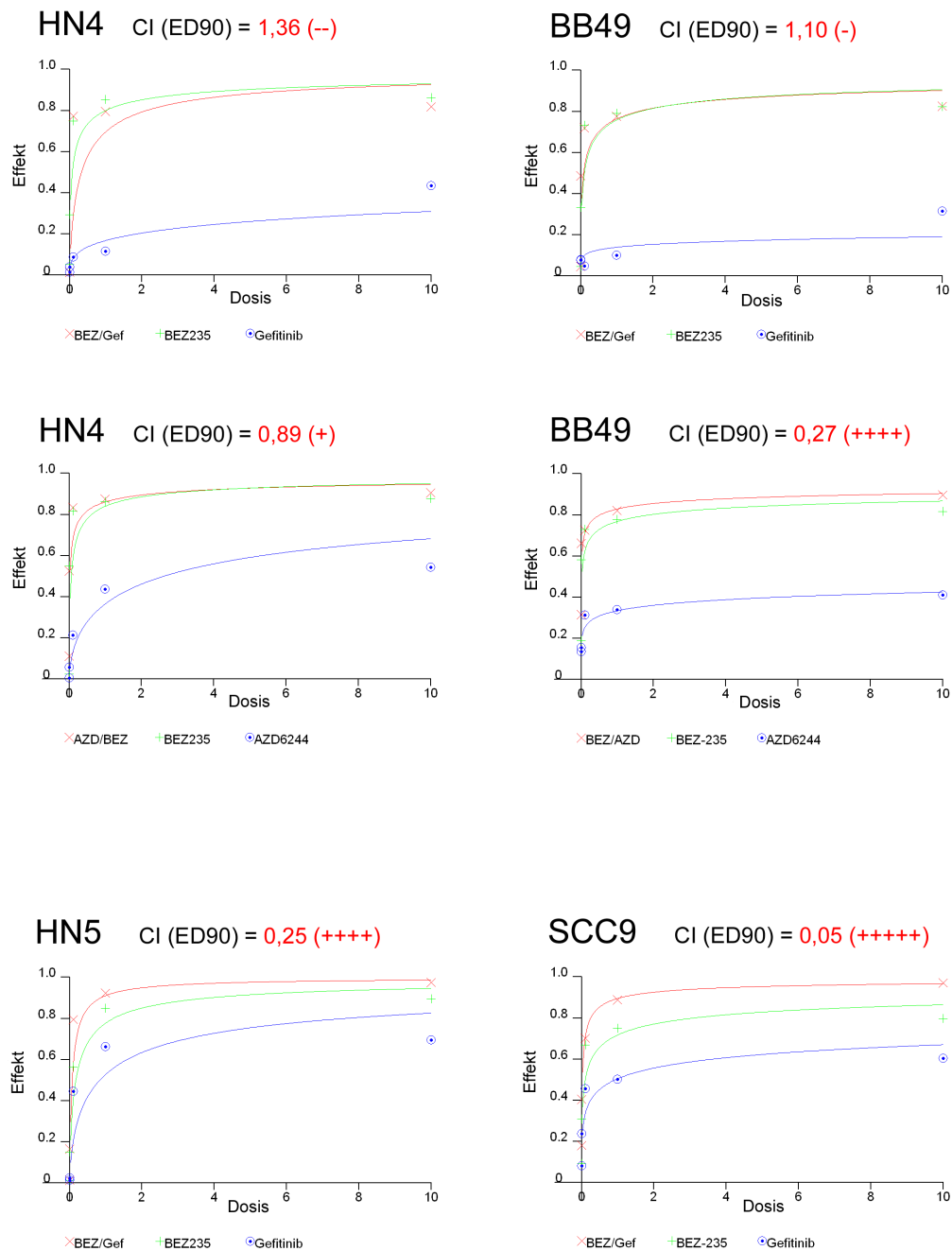


**Abb. 4.11 Western Blot der Zelllinien BB49 und HN4 nach einstündiger Inkubation mit Kombinationen der Inhibitoren Gefitinib, BEZ235 und AZD6244.** Es werden die phosphorylierten „p-“ (aktiven) Proteinlevel in direktem Bezug zum jeweiligen Totalprotein dargestellt. An Position 1 ist immer ein unbehandeltes Zelllysate als Negativkontrolle geladen, im Anschluss finden sich die Lysate der Behandlungen mit je 1μM Gefitinib (Spalte 2), BEZ235 (Spalte 3) und der Kombinationen Gefitinib + BEZ235 (Spalte 4)) und BEZ235 + AZD6244 (Spalte 5). Als Ladekontrolle wurde α-Actinin verwendet.

#### 4.5.2 Dosis-Wirkungsbeziehungen

Um synergistische und antagonistische Effekte der dualen Inhibition zu analysieren wurden die Vitalitätswerte nach 72-stündiger separater und kombinierter Inkubation mit der Software Calculusyn analysiert. Anhand des Zellüberlebens bei verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und die Effektivdosis ED90 und deren Konfidenzintervall berechnet. Auf diese Weise kann der Synergismus (ggf. Antagonismus) der dualen Anwendung von Inhibitoren geschätzt werden. In Abb. 4.12 sind die Kurven-Diagramme der Zelllinien HN4 und BB49 (BEZ235 + Gefitinib / BEZ235 + AZD6244) und der Zelllinien HN5 und SCC9 (nur BEZ235 + Gefitinib) dargestellt.

## Dosis-Wirkungskurven



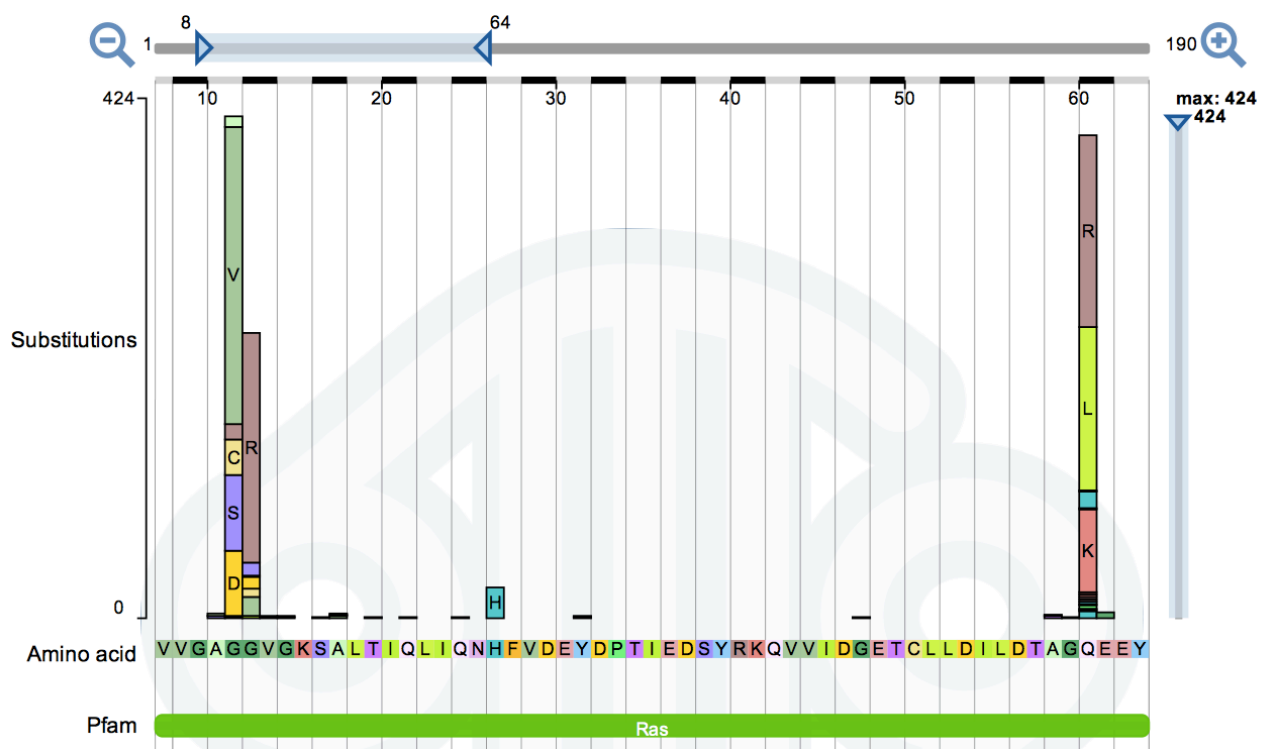
**Abb. 4.12 Dosis-Wirkungskurven bei dualer Inhibition mit BEZ235 + Gefitinib und BEZ235 + AZD6244.** Die Graphen zeigen die Dosis-Wirkungskurven nach 72-stündiger Inkubation mit Gefitinib, AZD6244 (beide blau), BEZ235 (grün) und den Kombinationen der Inhibitoren (rot). Die Konzentration des Inhibitors ist auf der X-Achse, der Dosis-effekt auf der y-Achse aufgetragen. Unter den Graphen befindet sich das errechnete Konfidenzintervall (CI) der Effektivdosis ED90 (Effektivdosis zur Hemmung von 90% des Wachstums). Anhand des Konfidenzintervalls leitet sich der Grad des Synergismus bzw. Antagonismus der dualen Inhibition ab und wird mit den Symbolen „++++“ (sehr starker Synergismus) bis „----“ (sehr starker Antagonismus) dargestellt.

Beim Vergleich von mutierten und Kontrollzelllinien zeigt sich bei den Gefitinib-sensitiven Kontroll-Zelllinien (SCC9, HN5) ein starker bis sehr starker synergistischer Effekt der Kombination BEZ235 + Gefitinib, wohingegen bei den mutierten, Gefitinib-resistenten Zelllinien (HN4, BB49) bei selbiger Kombination ein schwacher bis moderater Antagonismus der Inhibitoren vorliegt. Bei Kombination von PI3K und MEK-Inhibitoren konnte ein schwacher (HN4) bzw. sehr starker (BB49) Synergismus ausgelöst werden. Diese Ergebnisse sprechen für einen positiven Effekt der zusätzlichen MEK-Inhibition und stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Western Blots.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 HRAS-Mutationsanalysen

Zu Beginn unserer Studie untersuchten wir unsere HNSCC-Zelllinien sowie Tumorgewebeproben von Patienten mit plattenepithelialen Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs auf HRAS-Hotspot-Mutationen. Die Einschränkung auf die Hotspot-Kodons 12,13 und 61 wurde einerseits durch die zahlenmäßige Dominanz dieser Mutationen (s. Abb. 5.1) und andererseits durch die bislang ungewisse Bedeutung der seltenen und unbekannten Mutationen gewählt.



**Abb. 5.1 Die häufigsten HRAS-Mutationen** Ausschnitt aus dem Mutationsregister des HRAS-Gens Aminosäure 8 bis 64 mit den prozentual häufigsten Mutationen in den Kodons 12, 13 und 61 (Quelle: SANGER).

Hierbei konnten wir einen prozentualen Anteil der Hotspot Mutationen von 6,1% in HNSCC-Zelllinien und 3,6 % in HNSCC-Gewebeproben ermitteln. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit bereits veröffentlichten Daten. So berichteten 2011 Stransky et al. und Agrawal et al. in zwei groß angelegten genomischen Analysen erstmals von mutierten HRAS-Genen in plattenepithelialen Kopf-Hals-Tumoren. Das HRAS-Gen wurde hierbei als sechshäufigste Mutation mit einer Inzidenz von 4% (Agrawal et al., 2011) bzw. als achthäufigste Mutation mit einer Inzidenz von 5% (Stransky et al., 2011)



beschrieben. Pickering et al. konnten 2013 in einem Kollektiv von 38 HNSCC-Proben der Subgruppe oraler plattenepithelialer Karzinome in insgesamt 9 % der Patientenproben Mutationen in HRAS ausfindig machen (Pickering et al., 2013). Lui et al. beschrieben 4,6% ihrer 151 Proben als HRAS mutiert (Lui et al., 2013). Das TCGA-Projekt (*The Cancer Genome Atlas*) lieferte 306 sequenzierte Datensätze und konnte in 4% der Proben eine HRAS-Mutation nachweisen (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013; Kandoth et al., 2013). Kürzlich konnten übereinstimmend auch Rampias et al. in 180 HNSCC-Proben einen Anteil von 9,44 % der Tumore positiv auf HRAS-Mutationen testen (Rampias et al., 2014).

Gemäß der COSMIC-Datenbank für somatische Mutationen weisen, neben Tumoren der Haut und des Urogenitalbereichs, die Tumore aus dem Kopf-Hals-Bereich am häufigsten HRAS-Mutationen auf. Tabelle 5.1 zeigt eine Auflistung über die derzeitigen HRAS-Mutationsraten in verschiedenen Organ-/Gewebegruppen (Stand Juni 2014).

Gewebe	Proben	HRAS-Mutationen	%
Haut	3580	356	9,94
<b>Speicheldrüsen</b>	<b>363</b>	<b>34</b>	<b>9,37</b>
Harnwege	2458	224	9,11
Cervix	273	23	8,42
<b>Obere Luft- und Speisewege</b>	<b>1547</b>	<b>118</b>	<b>7,63</b>
Penis	28	2	7,14
Weichgewebe	926	38	4,1
Hoden	126	5	3,97
<b>Schilddrüse</b>	<b>5225</b>	<b>196</b>	<b>3,75</b>
Prostata	1000	33	3,3
Hypophyse	300	9	3
Thymus	46	1	2,17
Magen	691	14	2,03
Nebenniere	230	4	1,74
Genitaltrakt	65	1	1,54

**Tab. 5.1 HRAS-Mutationsraten der verschiedenen Gewebegruppen.** Die Tabelle zeigt die absolute Anzahl an positiv getesteten HRAS-Sequenzierungen, sowie den prozentualen Anteil im Vergleich zu allen untersuchten Proben. Die Kopf-Hals-Tumore (Speicheldrüsen, obere Luft- und Speisewege, Schilddrüse) sind blau hinterlegt (Quelle: SANGER).

Speicheldrüsen weisen HRAS-Mutationen in 9,37%, die oberen Luft- und Speisewege in 7,63% und die Schilddrüse in 3,75% auf. Fasst man somit die Tumore der Kopf-Hals-Region in eine Übergruppe zeigen sich in 6-7% der untersuchten Gewebeproben Mutationen im HRAS-Gen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir mittels unserer Sequenzierungsanalyse das Auftreten und die Häufigkeit der HRAS-Mutationen

in HNSCC bestätigen konnten. Alle von uns ermittelten Hotspot-Mutationen sind bereits in der online zugänglichen COSMIC-Datenbank beschrieben. Auch wenn HRAS ein weitaus selteneres Ereignis im Vergleich zu anderen tumorfördernden Alterationen darstellt, galt es primär zu untersuchen, ob HRAS onkogenes Potenzial besitzt und inwieweit es zu Tumorentstehung und -progression bzw. zu Resistenzen gegen die Therapien beiträgt.

## 5.2 Identifikation von HRAS als Treiber

Es ist schon lange bekannt, dass Ras eine wichtige Stellung als molekularer Schalter innerhalb der Signaltransduktion einnimmt und mutierte RAS Gene unkontrolliertes Wachstum in Zellen auslösen können. In dieser Arbeit konnte nun demonstriert werden, dass HRAS neben KRAS und NRAS als drittes Gen der RAS-Familie ebenfalls entscheidend das Tumorwachstum beeinflussen kann. Unter dem Gesichtspunkt, dass es für HNSCC bisher in Studien keinen Anhalt für mutierte Kras- und Nras-Proteine gibt, könnte HRAS eine entscheidende Stellung in den Zellen einnehmen. Nach dem gezielten Herunterregulieren der Hras-Proteine mittels RNA-Interferenz zeigten die HRAS mutierten Linien BB49, H357 und HN4 ein Zellüberleben von durchschnittlich nur knapp 50% im Vergleich zu den unbehandelten Negativkontrollen, während die HRAS-wt-Zelllinien bei gleichem Versuchsaufbau nahezu unbeeinflusst durch die Gen-Ausschaltung blieben. Die erfolgreiche Inhibition des Zellwachstums nach HRAS-Knockdown in Zusammenschau mit den reduzierten HRAS-Proteinleveln in Western Blots sprechen für eine gelungene Transfektion und somit erfolgreiche Ausschaltung bzw. Herunterregulierung des Zielproteins. Dieser Versuchsaufbau zeigt deutlich wie stark die Zellproliferation von der Präsenz des mutierten HRAS abzuhängen scheint. Ähnliche Effekte konnten 2011 Zuo et al. zeigen, als sie in Nasopharynx-Karzinomen nach HRAS-Knockdown erhöhte Zellsterberaten nachweisen konnten und im Rahmen ihrer Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen HRAS-Amplifikation und Cetuximab-Resistenz schlossen (Zuo & Luo, 2011). Auch Rampias et al. konnten in vier getesteten HNSCC-Zelllinien nach HRAS-Knockdown eine um etwa 20% eingeschränkte Zellproliferation beobachten, jedoch hier ohne Nachweis einer Apoptoseinduktion (Rampias et al., 2014).

Wir werten HRAS-Hotspot Mutationen aufgrund unserer vorliegenden in-vitro Ergebnisse als einen bedeutenden Faktor des Tumorwachstums in plattenepithelialen Kopf-Hals-Tumoren.

### 5.3 Cetuximab-Resistenz und die Bedeutung von HRAS

Als erstes wichtiges fehlreguliertes molekulares Zielobjekt der plattenepithelialen Kopf-Hals-Tumore wurde 1993 der EGF-Rezeptor identifiziert und als Folge dessen ist bis heute der monoklonale Antikörper und EGFR-Inhibitor Cetuximab das einzige zugelassene gezielte Therapeutikum, welches neben Chemo- und Radiotherapie für die Behandlung von HNSCC-Patienten in bestimmten Krankheitsstadien zugelassen ist (Grandis & Tweardy, 1993). In randomisierten Phase III Studien konnte erfolgreich gezeigt werden, dass bei lokal fortgeschrittener Erkrankung die Zugabe von Cetuximab zu einer Radio- bzw. Chemotherapie eine bessere loko-regionale Kontrolle und ein besseres Gesamtüberleben nach sich zieht (Bonner et al., 2010; 2006). Basierend für die Zulassung von Cetuximab mit platinbasierter Chemotherapie als standardisierte Erstlinien-Therapie bei rezidiertem und/oder metastasiertem Tumor war die US-Studie „EXTREME“, in der ein vereinzelt verbessertes Gesamtüberleben durch die Kombinationstherapie nachgewiesen werden konnte (Vermorken et al., 2008). Die Daten wurden 2014 bei der Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für klinische Onkologie (ASCO, *American Society of Clinical Oncology*) im Rahmen der Präsentation der 5-Jahres-Follow-Up Daten bekräftigt (Vermorken et al., 2014). Der Tumor scheint möglicherweise durch die zusätzliche Gabe des EGFR-Inhibitors für die eigentliche Chemotherapie oder Bestrahlung sensibilisiert zu werden. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch nicht erforscht. Die erhofften wachstumshemmenden Effekte der anti-EGFR Monotherapie blieben hingegen nach vielversprechenden präklinischen Studien größtenteils aus.

Bislang konnte kein plausibler Resistenzmechanismus gegen Cetuximab ausfindig gemacht werden, der das schlechte Ansprechen auf die Monotherapie erklärt. Die groß angelegten Sequenzierungs-Projekte der heutigen Zeit liefern eine ausführliche Aufschlüsselung der malignen Tumore auf molekularer Ebene und damit viele denkbare Ansatzpunkte für neue Medikamente (vgl. 5.1). Es gestaltet sich jedoch als langwieriger Prozess einzelne Mutationen abzugrenzen, die auch tatsächlich das Gleichgewicht

einer Zelle stören und zu einer Entartung führen. Darüber hinaus bedeutet ein entschlüsselter Treiber noch lange nicht, dass dieses auch wirkungsvoll blockiert werden kann. Speziell bei den Kopf-Hals-Tumoren zeigen sich größtenteils Alterationen in Tumorsuppressorgenen (Notch1, TP53, RB1), die durch ihren Ausfall die Tumorprogression fördern, somit nicht durch Inhibition ausgeschaltet werden können. Vielmehr müsste man hier therapeutisch die verloren gegangene Funktion des Tumorsuppressorgens wieder herstellen. Dieses Vorhaben hat sich bislang in der Tumorforschung als äußerst schwierig gestaltet und es steht bis dato keine systemische Therapie für die Wiederherstellung der Schlüsselproteine zur Verfügung (Loyo et al., 2013). Aktivierende Mutationen in Onkogenen zeigen sich in Kopf-Hals-Tumoren vergleichsweise selten. Gelingt es, ein Treiber zu entschlüsseln und ein passendes Medikament zur Verfügung zu haben bzw. zu entwickeln, werden die erhofften Erfolge häufig durch Toxizitätslimits oder Resistenzmechanismen behindert. Hierzu zählen vorwiegend Rückkopplungsmechanismen und Überschneidungen der einzelnen Signalachsen, die eine therapeutische Blockade geschickt umgehen.

Die Stellung von HRAS, als potenzielles Treiber-Onkogen, wurde bisweilen nur in einzelnen Studien in Bezug auf Resistenzen in soliden Tumoren untersucht. Luwor et al. veröffentlichten 2011 eine Arbeit über den Einfluss von onkogenem HRAS in Blasentumoren und konnten sowohl in vitro, als auch in vivo, eine erhöhte Resistenz gegen EGFR-Therapien nachweisen (Luwor, Lu, Li, Liang, & Fan, 2011). 2013 konnten erstmals Hah et al. in Kopf-Hals-Tumoren zeigen, dass die Transfektion einer aktivierenden HRAS-G12D/G12V-Mutation in eine EGFR-sensitive Zelllinie die Resistenz gegen den Inhibitor Erlotinib erhöhte (Hah et al., 2013). Übereinstimmend zeigten Rampias et al. in Kopf-Hals-Tumorzelllinien nach lentiviraler Transfektion mit G12V HRAS eine bis zu 55% gesteigerte Unterdrückung der Zellproliferation nach Cetuximab-Behandlung im Vergleich zu den Kontroll-Transfektionen. Erstmals konnte auch in vivo in einem Kollektiv von 55 HNSCC-Patienten, darunter 7 mit HRAS-Hotspot-Mutation, die geringere Wahrscheinlichkeit für ein Ansprechen auf Cetuximab nachgewiesen werden ( $p=0,046$ ) (Rampias et al., 2014).

Unter diesem Aspekt prüften wir zunächst das Ansprechen zahlreicher Zelllinien auf Gefitinib, einen Tyrosinkinaseinhibitor, der ähnlich dem monoklonalen Antikörper Cetuximab den EGF-Signalrezeptor inaktiviert. Passend zum schlechten klinischen Ansprechen auf die EGFR-Inhibition waren in unseren Testergebnissen 71,4% der

Zelllinien mäßig- bis hochgradig resistent gegen Gefitinib. Ein wesentlich kleinerer Anteil (28,6%) zeigte ein moderates bis gutes Ansprechen. Interessanterweise fanden sich unter den am stärksten ausgeprägten Gefitinib-Resistenzen unsere drei HRAS-mutierten Zelllinien. Diese zeigten nur eine minimale Wachstumshemmung und somit nahezu ungehindertes Tumorwachstum nach EGFR-Inhibitor-Inkubation. Umgekehrt konnte nach Einschleusen der G12D-Mutation in Wildtyp-Zellen der Trend einer steigenden Resistenz gegen die EGFR-Blockade beobachtet werden. Die Ergebnisse der Transfektion liegen in nur geringen Fallzahlen vor, zeigen jedoch prozentual eindrucklich einen besseren Überlebensvorteil und können, wenn auch nicht signifikant, als eine Tendenz gewertet werden. In Zusammenschau mit der bereits erläuterten Identifikation als relevantes Tumor-Gen und dem fehlenden Nachweis von anderen RAS Mutationen in HNSCC, verfestigte sich unsere Hypothese, dass HRAS-Mutationen als entscheidender Resistenzfaktor gegen die EGFR-Inhibitoren fungieren. Rückblickend ist die Wahl von Gefitinib als zentrales Therapeutikum unserer Studie als kritisch zu betrachten. Ein Vergleich unserer in-vitro Daten mit den Cetuximab-Ergebnissen sollte nur unter Vorbehalt gezogen werden, denn Tyrosinkinaseinhibitoren haben bislang in klinischen Studien enttäuschende Ergebnisse geliefert (Cohen et al., 2005; 2003; Kirby et al., 2006). Zuletzt wurden in einer groß angelegten Phase III Studie therapieresistente Patienten vergleichsweise mit Gefitinib und Methotrexat therapiert. Auch hier konnte kein Überlebensvorteil gegenüber dem Chemotherapeutikum verzeichnet werden (Stewart et al., 2009).

#### **5.4 Resistenzmechanismus**

Anti-EGFR Therapien finden seit einigen Jahren auch in anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise beim Darm- und Lungenkrebs ihre Anwendung. Beim Darmkrebs konnte unter anderem die KRAS-Mutation als ein ausschlaggebender Resistenzmechanismus ausfindig gemacht werden. Der Vorteil darin besteht, dass Patienten, die für eine Anti-EGFR-Therapie in Frage kommen, vorab auf KRAS Mutationen getestet und so für gezielte Therapien selektiert werden (Karapetis & Khambata-Ford, 2008; Linardou et al., 2011; Normanno et al., 2009). Könnte man also auch bei HNSCC-Patienten präziser vorhersagen, ob ein gutes Ansprechen auf Cetuximab bzw. aus welchen Gründen kein Ansprechen zu erwarten ist, könnten neue Therapieansätze erforscht werden. Auch die Entschlüsselung von zellulären Resistenzmechanismen ist notwendig, um die

Therapeutika zielgerichteter einsetzen und gegebenenfalls durch Kombinationen oder alternative Therapien ablösen zu können.

Bislang wurde bei HNSCC-Tumoren vermutet und belegt, dass HER2-Amplifikationen, die in etwa 40 - 60% auftreten, einen möglichen Resistenzmechanismus gegen Cetuximab darstellen. HER2 (ErbB2) gehört ebenso wie EGFR (ErbB1) zur Familie der ErbB-Rezeptorkinasen und kann durch Amplifikation des Rezeptors oder durch Hochregulierung des Liganden ungeachtet der EGFR-Blockade zu einer stetigen Aktivierung von ERK1/2 (MAPK-Signalweg) führen (Yonesaka et al., 2011). Eine Kombination aus EGFR und HER1/HER2 Inhibitor (Cetuximab + Lapatinib) wird momentan in einer klinischen Phase I Studie (NCT01184482) getestet (Mountzios, Rampias, & Psyrri, 2014).

Zuvor berichteten 2009 Seiwert et al., dass in 84% der HNSCC-Proben eine Überexprimierung der MET-Kinase vorliegt und präsentierten in einer präklinischen Studie ein gutes Ansprechen des Zellwachstums auf eine Kombination aus EGFR- und MEK-Inhibitoren (T. Y. Seiwert et al., 2009). Auch 2011 konnten übereinstimmend Xu et al. vielversprechende präklinische Daten für die duale Inhibition von EGFR und MET präsentieren (H. Xu et al., 2011).

Zum Verständnis des durch HRAS vermittelten Resistenzmechanismus sollten zunächst die Reaktionen auf die EGFR-Blockade auf Proteinebene untersucht werden. In Kopf-Hals-Tumoren konnte für den amplifizierten EGF-Rezeptor in früheren Publikationen gezeigt werden, dass dieser neben PI3K/AKT vornehmlich über den MEK/ERK-Signalweg schaltet (Kalyankrishna & Grandis, 2006). Bleibt die Blockade des EGF-Rezeptors erfolglos, so könnte einer dieser beiden Hauptsignalachsen durch Überexpression oder Mutation eines nachgeschalteten Proteins aktiviert sein. Durch die Behandlung von Gefitinib-resistenten und Gefitinib-sensitiven Zelllinien mit EGFR-Inhibitoren verschiedener Konzentration konnten wir den PI3K-Signalweg als einen entscheidenden und konstant aktivierten Signalweg in den resistenten Zellen ausfindig machen. Bei deutlich herunterregulierten pERK-Leveln blieben die pAkt-Level und dessen nachgeschaltetes Protein p4EBP1 selbst bei höchsten Inhibitorkonzentrationen unbeeinflusst. Daraus lässt sich schließen, dass die EGFR-Blockade keinen Einfluss auf die PI3K-Achse nimmt. Eine Aktivierung dieser Signalwege muss also auf eine andere Art und Weise bestehen, als durch den häufig amplifizierten EGF-Rezeptor. Rampias et al. veröffentlichten nach Fertigstellung unserer Studie ihre Daten bezüglich

einem durch HRAS vermittelten Resistenzmechanismus in HNSCC. Ähnlich unserer bereits dargelegten Ergebnisse, konnten auch Rampias et al. neben der RAS/MAPK/ERK-Achse die unerwartete Hochregulation der PI3K/AKT-Achse und deren Abhängigkeit von HRAS nachweisen. Diese Abhängigkeit von HRAS zeigte sich auch bei aktivem EGF-Rezeptor. Folglich könnte eine pharmakologische Blockierung dieser RAS/PI3K Interaktion die Cetuximab-Sensitivität wiederherstellen (Rampias et al., 2014).

Schon früh wurde versucht, Ras auf direktem Wege zu blockieren und medikamentös auszuschalten. Bis heute konnten jedoch keine geeigneten Substanzen für eine erfolgreiche Blockade entwickelt werden. Die neuesten Entwicklungsversuche widmen sich den niedermolekularen Inhibitoren (Ostrem, Peters, Sos, Wells, & Shokat, 2013; Zimmermann et al., 2013). Umso wichtiger scheint es, die genauen molekularbiologischen Schaltwege und Resistenzmechanismen zu entschlüsseln, um alternative Behandlungsstrategien zu entwickeln.

## 5.5 PI3K als vielversprechender neuer therapeutischer Ansatzpunkt

PI3K-Mutationen wurden in HNSCC in durchschnittlich 10,5% der getesteten Proben beobachtet und sind ein Faktor, der anti-EGFR-Therapien möglicherweise wirkungsarm macht (Agrawal et al., 2011; Lui et al., 2013; Pickering et al., 2013; Stransky et al., 2011). In der TCGA-Kohorte wurden PI3K-Mutationen sogar in bis zu 20,6% nachgewiesen (Kandoth et al., 2013). Diese Ergebnisse weichen jedoch stark von den bisherigen Ergebnissen ab und werden in der Literatur mit Skepsis diskutiert. Die PI3K-Achse wird aber nicht nur durch Mutationen direkt im Gen aus dem Gleichgewicht gebracht. Oftmals wird dies auch durch fehlregulierte vorgeschaltete oder nachgeschaltete Proteine ausgelöst. Bislang bekannte Alterationen die zu einer Hochregulierung der PI3K Achse führen, sind beispielsweise Mutationen in den Genen PIK3CA, PIK3R1, AKT und mTOR, aber auch der Verlust sogenannter Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise PTEN. Die einzelnen Komponenten des PI3K Signalwegs sind zusammengefasst in circa 30% der Kopf-Hals-Tumore mutiert und somit ein entscheidender, fehlregulierter und tumorprogressiver Mechanismus (Lui et al., 2013). Morris et al. berichten sogar von bis zu 70% genetischer Alterationen in Komponenten des PI3K Signalwegs, vornehmlich *Copy Number Variationen* (Morris et

al., 2011). Zusätzlich können Amplifikationen und Mutationen der vorgeschalteten Rezeptoren, wie beispielsweise EGFR, ErbB2, ErbB3, MET und VEGFR, den PI3K-Signalweg in der Zelle in gesteigertem Maße stimulieren (Engelman, 2009). Inwiefern neben EGFR anderweitige Rezeptorkinasen bei der Aktivierung von PI3K vorgeschaltet bzw. rückgekoppelt sind, bleibt zu untersuchen. HRAS-Mutationen und deren Auswirkungen wurden in bisherigen Publikationen nur von Rampias et al. der PI3K-Achse zugeordnet. Zuvor wurde ähnlich den KRAS- und NRAS-Mutationen eine Aktivierung der Ras/Raf/MAPK-Kaskade vermutet.

In unserer Arbeit konnten wir demonstrieren, dass RAS-Mutationen im HRAS-Gen scheinbar unabhängig des EGF-Rezeptors als Aktivator des PI3K/Akt-Signalwegs fungieren, nachdem die Akt-Level durch die EGFR-Inhibition nicht im Geringsten beeinflusst werden konnten. Daraufhin entschieden wir, die Überlebensraten unserer Zelllinien nach Inkubation mit verschiedenen PI3K-Inhibitoren zu messen und in einer Gegenüberstellung mit den Gefitinib-Daten zu analysieren.

Drei Klassen von PI3K-Inhibitoren werden momentan in klinischen Studien für Kopf-Hals-Tumoren getestet, nachdem primär sehr gute Ansprechraten gezeigt werden konnten (Holsinger et al., 2013). Die kombinierten PI3K/mTOR-Inhibitoren (BEZ235, GDC-0980), die reinen PI3K-Inhibitoren (BKM120, GDC-0941 und PX-866), sowie die alpha-spezifischen PI3K-Inhibitoren (BYL719) befinden sich alle in klinischen Phase I- oder II- Studien (Mountzios et al., 2014). Übereinstimmend zur aktuellen Studienlage konnte auch in unseren Versuchsreihen eine erfolgreiche proliferationshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung in den Tumorzelllinien herbeigeführt werden. In mehreren Studien innerhalb verschiedener Forschungsfachgebiete konnte gezeigt werden, dass BEZ235 die Apoptose einleitet und in diesem Rahmen auch erfolgreich die Proliferationslevel senkt (Brachmann et al., 2009; Engelman et al., 2008; Liu et al., 2009; Serra et al., 2008). Nach aktueller Studienlage ist noch völlig unklar, welcher Subtyp der PI3K-Inhibitoren bei Kopf-Hals-Tumoren die besten Ansprechraten liefert. In unseren Ergebnissen zeigten BEZ235 und GDC-0980 die sensitivsten Ergebnisse, dicht gefolgt von GDC-0941. Zieht man Vergleiche zu den Überlebensdaten nach Gefitinib-Inkubation, so zeigt sich ein signifikant besseres Ansprechen aller Zelllinien auf die PI3K Inhibition.



Die häufig auftretende EGFR-Überexpression und gleichzeitige Hochregulierung der PI3K-Achse legt eine optimale Therapie durch Blockade beider Angriffspunkte nahe. In den HRAS-mutierten Zelllinien lies sich in unseren Versuchen kein Synergismus der dualen Inhibition nachweisen. Hier scheint die PI3K-Aktivierung dominant und komplett abgekoppelt von den Rezeptortyrosinkinasen zu sein. Auch in Western Blots und Dosis-Wirkungskurven zeigten sich keine vorteilsbringenden Effekte. Erst eine Kombination mit einem MEK-Inhibitor, also eine Blockade der Ras/Raf-Kaskade auf einem nachgeschalteten Level, konnte die pERK-Proteinlevel zusätzlich senken. Hier wären also durchaus positive Therapieeffekte im Vergleich mit einer alleinigen PI3K-Blockade denkbar. Mutmaßlich könnte eine hohe Toxizität dieser dualen Blockade beider Hauptsignalachsen die Behandlungsmöglichkeiten einschränken.

Biomarker, die ein gutes Ansprechen auf eine PI3K-Therapie andeuten, können heute noch nicht final definiert werden. Erste Ergebnisse aus frühen klinischen Studien bei verschiedenen Tumorentitäten bestätigen die Annahme, dass Patienten mit PI3K-Hotspot-Mutation sehr gute Ansprechraten auf PI3K-Inhibitoren zeigen (Janku et al., 2013). Mit unserer Arbeit gelang es, HRAS, das bisher nicht in Verbindung mit einer hochregulierten PI3-Kinase stand, als einen potenziellen Biomarker für EGFR-Resistenz und PI3K-Sensitivität zu definieren. In Hinblick auf den hohen Anteil an mutierten Tumorsuppressorgenen und die schwierige und kritische Entwicklung der molekularen Therapeutika erscheint es essenziell, alle potenziellen Biomarker für die zielgerichteten Therapien zu definieren und in vivo zu belegen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Fortschritte der Molekularbiologie ermöglichen heutzutage in der onkologischen Forschung die rasche Sequenzierung von kompletten genomischen DNA-Sequenzen. Die Detektion der dominierenden genetischen und epigenetischen Fehlregulierungen molekularer Signalwege erwecken die Hoffnung auf ein besseres Verständnis von Tumorentstehung, -progression und -erhalt. Ein detailliertes Wissen über die zugrunde liegenden Signalverschaltungen ist für ein gezieltes Eingreifen und die Entwicklung neuer therapeutischer Ansatzpunkte notwendig. Auch plattenepitheliale Kopf-Hals-Tumore (HNSCC) zeigen sehr heterogene molekulare Subtypen, die aufgrund multipler ätiologischer Faktoren entstehen. Eine Entschlüsselung des genetischen Fingerabdrucks eines Tumors soll helfen eine personalisierte Therapie zu planen. Trotz signifikanter Fortschritte in der Tumorforschung und multimodalen Behandlungen ist bei der nur langsam voranschreitenden Entwicklung neuer, zielgerichteter Substanzen bis heute die Prävention, Früherkennung und engmaschige Überwachung die effektivste Methode, um Morbidität und Mortalität zu senken.

Die Überexpression des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) geht einher mit einer schlechten Prognose der Kopf-Hals-Tumore. Die Ergebnisse der EGFR-Inhibition blieben jedoch weit hinter den Erwartungen zurück. Der Grad der Überexpression lässt keinen Rückschluss auf ein gutes Ansprechen der Tumore bei EGFR-Inhibition zu. Resistenzmechanismen konnten bisweilen nur ansatzweise definiert werden. Bis heute bleibt der EGFR-Inhibitor Cetuximab jedoch das einzige zielgerichtete zugelassene molekulare Therapeutikum in der Therapie der Kopf-Hals-Tumore, das bei passender Indikation in Kombination mit platinbasierter Chemo- und Radiotherapie angewandt wird.

Mittlerweile konnte in multiplen Sequenzierungsanalysen ein signifikanter Anteil von HRAS-Mutationen nachgewiesen werden. Ziel unserer Arbeit war es, mittels Sanger-Sequenzierung die Mutationsrate in unseren HNSCC Gewebeproben und Zelllinien zu bestätigen und anschließend in vitro mittels Western Blots, Vitalitäts- und Apoptosetests die Stellung von mutiertem HRAS in den Tumorzellen zu definieren. Hierbei gelang es, HRAS als einen weiteren potenziellen Resistenzfaktor der EGFR-Inhibition zu ermitteln, der in mutiertem Zustand Tumorzellen einen starken Überlebensvorteil bietet und zur Resistenz gegen Cetuximab beiträgt.

Erstmals konnten wir anhand von Western Blot Analysen einen Zusammenhang zwischen HRAS-Mutationen und einer hochregulierten PI3K-Achse nachweisen, die unabhängig vom EGF-Rezeptor aktiviert wird und zugleich eine neue therapeutische Angriffsfläche für diesen Mutationstyp liefert. Multiple therapeutische Strategien gegen PI3K befinden sich momentan in frühen Phasen klinischer Studien, da PI3K das meist mutierte Onkogen und die PI3K-Achse eine der am häufigsten alterierten Signalwege in Kopf-Hals-Tumoren darstellt. In unseren Versuchen zeigten sich PI3K-Inhibitoren in allen getesteten Zelllinien als vielversprechender proliferationshemmender und apoptoseinduzierender Wirkstoff. Kombinierte Therapien, die beide Hauptsignalachsen blockieren, können je nach genetischem Subtyp individualisiert zu einem Behandlungsvorteil verhelfen. Die HRAS-mutierten Linien zeigten in unseren Versuchen in der Kombination PI3K- und MEK-Inhibitor ein besseres Ansprechen als bei Monotherapie. Kombinationen von PI3K- und EGFR-Inhibitoren lieferten hingegen keine synergistischen Effekte.

In Zukunft wird das genetische Screening der Tumore eine zentrale Stellung im klinischen Alltag einnehmen und frühe Diagnosen sowie zielgerichtete Therapien ermöglichen. In dieser Arbeit stützen unsere Beobachtungen die Hypothese des onkogenen HRAS, das in vitro als Biomarker für die Resistenz gegen EGFR-Inhibitoren dient und ein gutes Ansprechen auf PI3K-Therapien verspricht.

## LITERATUR

- Agrawal, N., Frederick, M. J., Pickering, C. R., et al. (2011). Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science*, 333(6046), 1154–1157. doi:10.1126/science.1206923
- Ang, K. K., Berkey, B. A., Tu, X., Zhang, H.-Z., Katz, R., Hammond, E. H., et al. (2002). Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Research*, 62(24), 7350–7356.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., et al. (2010). Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The Lancet Oncology*, 11(1), 21–28. doi:10.1016/S1470-2045(09)70311-0
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., et al. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 354(6), 567–578. doi:10.1056/NEJMoa053422
- Bornstein, S., White, R., Malkoski, S., Oka, M., Han, G., Cleaver, T., et al. (2009). Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 119(11), 3408–3419. doi:10.1172/JCI38854
- Bos, J. (1989). ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research*.
- Brachmann, S. M., Hofmann, I., Schnell, C., Fritsch, C., Wee, S., Lane, H., et al. (2009). Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22299–22304. doi:10.1073/pnas.0905152106
- Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., et al. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45(10), 1113–1120. doi:10.1038/ng.2764
- Catenacci, D., & Seiwert, T. (2011). Molecular profiling of cancer—the future of personalized cancer medicine: A primer on cancer biology and the tools necessary to bring molecular testing to the .... *Seminars in ....*
- Chang, E. H., Furth, M. E., Scolnick, E. M., et al. (1982). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*, 297(5866), 479–483.
- Cohen, E. E. W., Kane, M. A., List, M. A., Brockstein, B. E., Mehrotra, B., Huo, D., et al. (2005). Phase II trial of gefitinib 250 mg daily in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(23), 8418–8424. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1247
- Cohen, E. E. W., Rosen, F., Stadler, W. M., Recant, W., Stenson, K., Huo, D., & Vokes, E. E. (2003). Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(10), 1980–1987. doi:10.1200/JCO.2003.10.051
- Cooper, J. S., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Campbell, B. H., Saxman, S. B., et al. (2004). Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 350(19), 1937–1944. doi:10.1056/NEJMoa032646
- D'Souza, G. G., & Dempsey, A. A. (2011). The role of HPV in head and neck cancer

- and review of the HPV vaccine. *Preventive Medicine*, 53 Suppl 1, S5–S11. doi:10.1016/j.ypmed.2011.08.001
- Dotto, G. P. (2008). Notch tumor suppressor function. *Oncogene*, 27(38), 5115–5123. doi:10.1038/onc.2008.225
- Engelman, J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations, 1–13. doi:10.1038/nrc2664
- Engelman, J. A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A. R., Upadhyay, R., et al. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature Medicine*, 14(12), 1351–1356. doi:10.1038/nm.1890
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*, 7(8), 606–619. doi:10.1038/nrg1879
- Forastiere, A. A., Forastiere, A. A., Goepfert, H., Goepfert, H., Maor, M., Maor, M., et al. (2003). Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 349(22), 2091–2098. doi:10.1056/NEJMoa031317
- Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., et al. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), 709–720.
- Grandis, J. R. & Tweardy, D. J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Research*, 53(15), 3579–3584.
- Gupta, S., Kong, W., Peng, Y., Miao, Q., & Mackillop, W. J. (2009). Temporal trends in the incidence and survival of cancers of the upper aerodigestive tract in Ontario and the United States. *International Journal of Cancer*, 125(9), 2159–2165. doi:10.1002/ijc.24533
- Hah, J. H., Zhao, M., Pickering, C. R., Frederick, M. J., Andrews, G. A., Jasser, S. A., et al. (2013). HRAS mutations and resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head & Neck*. doi:10.1002/hed.23499
- Hama, T. T., Yuza, Y. Y., Saito, Y. Y., O-uchi, J. J., Kondo, S. S., Okabe, M. M., et al. (2009). Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. *Audio, Transactions of the IRE Professional Group on*, 14(9), 900–908. doi:10.1634/theoncologist.2009-0058
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 14–14. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hancock, J. F., & Parton, R. G. (2005). Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochemical Journal*, 389(Pt 1), 1–11. doi:10.1042/BJ20050231
- Hashibe, M. M., Brennan, P. P., Benhamou, S. S., et al. (2007). Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(10), 777–789. doi:10.1093/jnci/djk179
- Holsinger, F. C., Piha-Paul, S. A., Janku, F., Hong, D. S., Atkins, J. T., Tsimberidou, A. M., & Kurzrock, R. (2013). Biomarker-directed therapy of squamous carcinomas of the head and neck: targeting PI3K/PTEN/mTOR pathway. *Journal of Clinical*

- Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(9), e137–40. doi:10.1200/JCO.2012.43.2716
- Janku, F., Wheler, J. J., Naing, A., Falchook, G. S., Hong, D. S., Stepanek, V. M., et al. (2013). PIK3CA mutation H1047R is associated with response to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors in early-phase clinical trials. *Cancer Research*, 73(1), 276–284. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1726
- Jemal, A., DVM, Siegel, P. R., Xu, M. J., & Ward, M. E. (2010). Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 1–24. doi:10.1002/caac.20073
- Johnson, L. L., Greenbaum, D. D., Cichowski, K. K., Mercer, K. K., Murphy, E. E., Schmitt, E. E., et al. (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes & Development*, 11(19), 2468–2481.
- Kalyankrishna, S., & Grandis, J. R. (2006). Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(17), 2666–2672. doi:10.1200/JCO.2005.04.8306
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., et al. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), 333–339. doi:10.1038/nature12634
- Karapetis, C., & Khambata-Ford, S. (2008). K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer — NEJM. ... *England Journal of ...*
- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 9(7), 517–531. doi:10.1038/nrm2438
- Kirby, A. M., A'Hern, R. P., D'Ambrosio, C., Tanay, M., Syrigos, K. N., Rogers, S. J., et al. (2006). Gefitinib (ZD1839, Iressa) as palliative treatment in recurrent or metastatic head and neck cancer. *British Journal of Cancer*, 94(5), 631–636. doi:10.1038/sj.bjc.6602999
- Kundu, S. K., & Nestor, M. (2012). Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumor Biology*, 33(3), 707–721. doi:10.1007/s13277-012-0350-2
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2010). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 11(1), 9–22. doi:10.1038/nrc2982
- Licitra, L., Störkel, S., Kerr, K. M., Van Cutsem, E., Pirker, R., Hirsch, F. R., et al. (2013). Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(6), 1161–1168. doi:10.1016/j.ejca.2012.11.018
- Linardou, H., Briasoulis, E., Dahabreh, I. J., et al. (2011). All about KRAS for clinical oncology practice: Gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 37(3), 221–233. doi:10.1016/j.ctrv.2010.07.008
- Liu, T.-J., Koul, D., LaFortune, T., Tiao, N., Shen, R. J., Maira, S.-M., et al. (2009). NVP-BEZ235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(8), 2204–2210. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0160
- Loyo, M., Li, R. J., Bettgowda, C., Pickering, C. R., Frederick, M. J., Myers, J. N., & Agrawal, N. (2013). Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head & Neck*, 35(3), 454–463. doi:10.1002/hed.23100
- Lu, S.-L., Herrington, H., Reh, D., Weber, S., Bornstein, S., Wang, D., et al. (2006). Loss of transforming growth factor-beta type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes & Development*, 20(10), 1331–1342. doi:10.1101/gad.1413306

- Lui, V. W. Y., Hedberg, M. L., Li, H., Vangara, B. S., Pendleton, K., Zeng, Y., et al. (2013). Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discovery*, 3(7), 761–769. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0103
- Luwor, R. B., Lu, Y., Li, X., Liang, K., & Fan, Z. (2011). Constitutively active Harvey Ras confers resistance to epidermal growth factor receptor–targeted therapy with cetuximab and gefitinib. *Cancer Letters*, 306(1), 85–91. doi:10.1016/j.canlet.2011.02.035
- Millon, R. R., Muller, D. D., Schultz, I. I., Salvi, R. R., Ghnassia, J. P. J., Frebourg, T. T., et al. (2001). Loss of MDM2 expression in human head and neck squamous cell carcinomas and clinical significance. *Oral Oncology*, 37(8), 620–631.
- Morris, L. G. T., Taylor, B. S., Bivona, T. G., Gong, Y., Eng, S., Brennan, C. W., et al. (2011). Genomic dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/PI3K pathway reveals frequent deletion of the EGFR phosphatase PTPRS in head and neck cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(47), 19024–19029. doi:10.1073/pnas.1111963108
- Mountzios, G., Rampias, T., & Psyrri, A. (2014). The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. doi:10.1093/annonc/mdu143
- Müller, O., & Wagener, C. (2009). *Molekulare Onkologie*. Georg Thieme Verlag.
- Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., et al. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO Journal*, 8(13), 4099–4105.
- Normanno, N., Tejpar, S., Morgillo, F., De Luca, A., Van Cutsem, E., & Ciardiello, F. (2009). Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 6(9), 519–527. doi:10.1038/nrclinonc.2009.111
- Okami, K., Reed, A. L., Cairns, P., et al. (1999). Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 18(23), 3541–3545. doi:10.1038/sj.onc.1202837
- Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A., & Shokat, K. M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, 503(7477), 548–551. doi:10.1038/nature12796
- Pacold, M. E., Suire, S., Perisic, O., et al. (2000). Crystal Structure and Functional Analysis of Ras Binding to Its Effector Phosphoinositide 3-Kinase @c. *Cell*, 103(6), 13–13. doi:10.1016/S0092-8674(00)00196-3
- Pickering, C. R., Zhang, J., Yoo, S. Y., Bengtsson, L., Moorthy, S., Neskey, D. M., et al. (2013). Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discovery*, 3(7), 770–781. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0537
- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., & Albert, Š. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1177–1195. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.01.012
- Rampias, T., Giagini, A., Siolos, S., Matsuzaki, H., Sasaki, C. T., Scorilas, A., & Psyrri, A. (2014). RAS/ PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2721
- Rangarajan, A. A., Hong, S. J. S., Gifford, A. A., et al. (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*, 6(2), 13–13. doi:10.1016/j.ccr.2004.07.009

- Reed, A. L., Califano, J., Cairns, P., et al. (1996). High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 56(16), 3630–3633.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., et al. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370(6490), 527–532. doi:10.1038/370527a0
- Sansal, I., & Sellers, W. R. (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *Journal of Clinical Oncology*, 22(14), 2954–2963. doi:10.1200/JCO.2004.02.141
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75(3), 495–505.
- Seiwert, T. Y., Jagadeeswaran, R., Faoro, L., et al. (2009). The MET Receptor Tyrosine Kinase Is a Potential Novel Therapeutic Target for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 69(7), 3021–3031. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2881
- Serra, V., Markman, B., Scaltriti, M., Eichhorn, P. J. A., Valero, V., Guzman, M., et al. (2008). NVP-BE235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Research*, 68(19), 8022–8030. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1385
- Stewart, J. S. W., Cohen, E. E., Licitra, L., Van Herpen, C. M., Khorprasert, C., Soulieres, D., et al. (2009). Phase III Study of Gefitinib Compared With Intravenous Methotrexate for Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of Clinical Oncology*, 27(11), 1864–1871. doi:10.1200/JCO.2008.17.0530
- Stransky, N., Egloff, A. M., Tward, A. D., et al. (2011). The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science*, 333(6046), 1157–1160. doi:10.1126/science.1208130
- Sturgis, E. M., & Cinciripini, P. M. (2007). Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*, 110(7), 1429–1435. doi:10.1002/cncr.22963
- Syrjänen, S., (2005). Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Clinical and Diagnostic Virology*, 32 Suppl 1, 8–8. doi:10.1016/j.jcv.2004.11.017
- Vermorken, J. B., Herbst, R. S., Leon, X., Amellal, N., & Baselga, J. (2008a). Overview of the efficacy of cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck in patients who previously failed platinum-based therapies. *Cancer*, 112(12), 2710–2719. doi:10.1002/cncr.23442
- Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., et al. (2008b). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1116–1127. doi:10.1056/NEJMoa0802656
- Vermorken, J. B. (2014). Platinum-based chemotherapy (CT) plus cetuximab in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck cancer (R/M-SCCHN): 5-year follow-up data for the extreme trial. *2014 ASCO Annual Meeting*, Abstract No: 6021
- Wagener C., & Müller O., Hrsg. 2010, Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Dritte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737–738. doi:10.1038/171737a0
- Weinberg R., Hrsg. 2013, The Biology of Cancer, Second Edition, New York: Garland Science.



- Westra, W. H. (2009). The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head and Neck Pathology*, 3(1), 78–81. doi:10.1007/s12105-009-0100-y
- Wheeler, D. L., Dunn, E. F., & Harari, P. M. (2010). Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 7(9), 493–507. doi:10.1038/nrclinonc.2010.97
- Wheeler, D. L., Huang, S., Kruser, T. J., et al. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, 27(28), 3944–3956. doi:10.1038/onc.2008.19
- Xu, H., Stabile, L. P., Gubish, C. T., Gooding, W. E., Grandis, J. R., & Siegfried, J. M. (2011). Dual blockade of EGFR and c-Met abrogates redundant signaling and proliferation in head and neck carcinoma cells. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(13), 4425–4438. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3339
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., et al. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 24052–24056.
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 2(2), 127–137. doi:10.1038/35052073
- Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., et al. (2011). Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Science Translational Medicine*, 3(99), 99ra86. doi:10.1126/scitranslmed.3002442
- Zimmermann, G., Papke, B., Ismail, S., Vartak, N., Chandra, A., Hoffmann, M., et al. (2013). Small molecule inhibition of the KRAS-PDEδ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature*, 497(7451), 638–642. doi:10.1038/nature12205
- Zuo, Q., & Luo, R.-C. (2011). [Effects of silencing H-ras gene by RNA interference on cetuximab-sensitivity of cetuximab-resistant human nasopharyngeal carcinoma cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese Journal of Oncology]*, 33(8), 574–578.

#### Internet:

##### GEKID

<http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Atlas/CurrentVersion/Inzidenz/atlas.html>

##### EMA

[http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000558/WC500029119.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf)

##### NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/>

##### GENECARDS

<http://www.genecards.org>

##### SANGER

<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>

## **DANKSAGUNG**

Die zugrunde liegenden Daten dieser Arbeit wurden von April 2011 bis Mai 2012 im Labor von Dr. Tanguy Seiwert an der University of Chicago, Department of Medicine, Section Hematology and Oncology erhoben. Die Arbeit wurde unterstützt durch ein Forschungsstipendium der Universität München (PROSA<sup>LMU</sup>).

Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang...

... Dr. Tanguy Seiwert, MD, der mir die Möglichkeit gab nach Chicago zu kommen, um ein Projekt in seinem Labor zu erarbeiten.

... Prof. Dr. med. Harréus, der mich über den gesamten Zeitraum und insbesondere beim Verfassen der Arbeit tatkräftig unterstützte.

... Arun Khattri und Michaela Keck, die mir mit ihren fundierten Laborkenntnissen stets zur Seite standen und mich durch mein Projekt begleitet haben.

... Zhixiang Zuo, der sich der statistischen Analysen meiner Daten annahm und auch aus der Ferne stets ein offenes Ohr für mich hatte.

... dem gesamten Seiwertlab-Team: Damian Rieke, Anna Ress, Kelley Leung, Derya Mahmutoglu, Zhixiang Zuo, Arun Khattri und Michaela Keck für eine sehr kurzlebige und spannende Zeit in Chicago und die super Arbeitsatmosphäre.

... zu guter Letzt meinen Eltern Franz und Iris, die mir das Vertrauen geschenkt haben und mich auf diesem langen Weg stets im Hintergrund unterstützt haben, sowie Ellen insbesondere für ihr Verständnis und ihre Geduld während dieser Zeit.

## PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### Koautorenschaften

Schaller, T., Bode, M., Berlis, A., Frühwald, M. C., Lichtmanegger, I., Endhardt, K., & Märkl, B. (2015). Specific immunohistochemical pattern of carbonic anhydrase IX is helpful for the diagnosis of CNS hemangioblastoma. *Pathology - Research and Practice*

Keck, M. K., Zuo, Z., Khattri, A., Stricker, T. P., Brown, C. D., Imanguli, M., et al. (2015). Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(4), 870–881. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2481

**EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

H-RAS-Mutationen in Kopf-Hals-Tumoren und Resistenzentwicklungen gegen Anti-EGFR-Therapien

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand